

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

**Lek. Patrycja Molek-Dziadosz**

*Arginine and its metabolites in acute myocardial infarction*

Arginina i jej metabolity w zawale mięśnia sercowego

*Praca doktorska*

Promotor: dr hab. n med. Jarosław Zalewski

Pracę wykonano w Klinice Choroby Wieńcowej i Niewydolności  
Serca w Krakowskim Szpitalu Specjalistycznym im. Jana Pawła II

Kierownik jednostki prof. dr hab. n. med. Jadwiga Nessler

Kraków, 2022 rok

Dziękuję mojemu Promotorowi za okazane  
od samego początku mojej drogi naukowej pomoc i wsparcie,  
bez których praca ta nie mogłaby powstać

## SPIS TREŚCI

1. Bibliometria .....	4
2. Wykaz stosowanych skrótów.....	6
3. Wprowadzenie .....	8
3.1. Metabolizm argininy .....	8
3.2. Metabolizm argininy a proces miażdżycy .....	10
3.3. Metabolizm argininy w ostrym zespole wieńcowym .....	12
3.4. Metabolizm argininy jako cel terapeutyczny .....	13
4. Hipoteza i cel .....	15
5. Publikacje wchodzące w skład dysertacji .....	16
6. Materiał i metody .....	69
6.1. Charakterystyka badanych grup, kryteria włączenia, wyłączenia .....	69
6.1.1. Publikacja 1.....	69
6.1.2. Publikacja 2.....	69
6.1.3. Publikacja 3.....	71
6.2. Zastosowane metody diagnostyczne.....	71
6.3. Statystyka .....	75
7. Podsumowanie wyników .....	77
7.1. Publikacja 1.....	77
7.2. Publikacja 2.....	79
7.3. Publikacja 3.....	81
8. Dyskusja i wnioski.....	83
9. Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim .....	88
10. Streszczenie pracy doktorskiej w języku angielskim .....	92
11. Piśmiennictwo.....	96
12. Opinia Komisji Bioetycznej.....	102
13. Oświadczenia współautorów .....	104

## 1. Bibliometria

Poniższa praca doktorska pt. „*Arginine and its metabolites in acute myocardial infarction*” (*Arginina i jej metabolity w zawale mięśnia sercowego*) powstała w oparciu o trzy artykuły opublikowane w czasopiśmie naukowym indeksowanym w bazie PubMed oraz znajdujących się na liście Journal Citation Reports (Thomson Reuters, Clarivate Analytics).

Praca powstała w oparciu o wyniki badań uzyskane przeze mnie w trakcie pracy jako współbadacz w projekcie OPUS finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Ładunek niestabilnych blaszek miażdżycowych związany z upośledzonym potencjałem naprawczym sieci fibrynowej determinuje przetrwałe ryzyko prozakrzepowe po zawale serca” (grant nr 2016/21/B/NZ5/01378, beneficjent Jarosław Zalewski).

### Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską:

	<b>Tytuł publikacji</b>	<b>Punkty MNiSW</b>	<b>Impact factor</b>
1.	„The shifted balance of arginine metabolites in acute myocardial infarction patients and its clinical relevance.” <b>Molek P</b> , Zmudzki P, Włodarczyk A, Nessler J, Zalewski J. <i>Sci Rep.</i> 2021;11:83.	140	4.996
2.	„Thin-cap fibroatheroma and increased coronary intima-media thickness are associated with an altered arginine metabolites balance.” <b>Molek P</b> , Żmudzki P, Machnik A, Nowak G, Stępień K, Wnuk M, Włodarczyk A, Nowak K, Rychlak R, Nessler J, Zalewski J. <i>Pol Arch Intern Med.</i> 2022;16356.	140	5.218

3.	„Coronary artery dissection following aortic valve replacement. How can one deal with this rare yet life-threatening complication?” <b>Molek P</b> , Nessler J, Zalewski J <i>J Card Surg.</i> 2019;34:147-150.	40	1.49
<b>Podsumowanie punktów</b>		<b>320</b>	<b>11.704</b>

**Pozostały dorobek naukowy:**

Rodzaj publikacji	Liczba	Punkty MNiSW	Impact factor
Prace włączone do pracy doktorskiej	3	320	11.704
Prace nie włączone do pracy doktorskiej	13	966	45.088
<b>Razem</b>	<b>16</b>	<b>1286</b>	<b>56.792</b>

Poza wymienionymi pracami w czasopismach indeksowanych z *Impact Factor* jestem pierwszą autorką jednego rozdziału w książce oraz pięciu artykułów przeglądowych. Ponadto prace, których byłam pierwszą autorką, prezentowane były na międzynarodowych kongresach m.in. International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Congress 2022 w Londynie, American Heart Association Scientific Sessions 2021 w Bostonie, ESC Congress 2020 – The Digital Experience, ESC Congress 2022 w Barcelonie. Zostałam wyróżniona nagrodą za najlepszą pracę z zakresu badań podstawowych wygłoszoną na Kongresie PTK w roku 2021 oraz otrzymałam stypendium *The Polish School of Medicine Memorial Fund* na odbycie stażu naukowego z zakresu obrazowania serca metodą rezonansu magnetycznego i tomografii komputerowej na Uniwersytecie w Edynburgu.

## 2. Wykaz stosowanych skrótów

AAR (ang. *area at risk*) - obszar zagrożony zawałem

ADMA (ang. *asymmetric dimethylarginine*) - asymetryczna dimetyloarginina

BH4 (ang. *tetrahydrobiopterin*) - tetrahydrobiopteryna

CABG (ang. *coronary artery bypass grafting*) - pomostowanie aortalno-wieńcowe

CAT-1 (ang. *cationic amino acid transporter 1*) - białko nośnikowe CAT-1

CMR (ang. *cardiac magnetic resonance*) - rezonans magnetyczny serca

eNOS (ang. *endothelial nitric oxide synthasis*) - śródbłonkowa syntaza tlenu azotu

GABA (ang. *gamma-aminobutyric acid*) - kwas gamma-aminomasłowy

GABR (ang. *global arginine bioavailability ratio*) - wskaźnik biodostępności argininy

hs-CRP (ang. *high sensitivity C-reactive protein*) - wysokoczułe białko C-reaktywne

ICAM-1 (ang. *Intercellular Adhesion Molecule 1*) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1

iNOS (ang. *inducible nitric oxide synthasis*) - indukowalna syntaza tlenu azotu

IRA (ang. *infarct-related artery*) - tętnica dozawałowa

IS (ang. *infarct size*) - strefa zawału

IVUS (ang. *intravascular ultrasound*) - wewnątrzwieńcowa ultrasonografia dopplerowska

LBBB (ang. *left bundle branch block*) - blok lewej odnogi pęczka Hissa

LDL-C (ang. *low-density lipoprotein cholesterol*) - cholesterol o typie lipoproteiny o niskiej gęstości

LVEDV (ang. *left ventricular end-diastolic volume*) - objętość końcoworozkurczowa lewej komory

LVESV (ang. *left ventricular end-systolic volume*) - objętość końcowoskurczowa lewej komory

LVEF (ang. *left ventricular ejection fraction*) - frakcja wyrzutowa lewej komory

MI (ang. *myocardial infarction*, MI) - zawał mięśnia sercowego

MMA (ang. *N-monomethyl-L-arginine*) - N-monometylo-L-arginina

MVO (ang. *microvascular obstruction*) - obszar obstrukcji mikrokążenia

NO (ang. *nitric oxide*) - tlenek azotu

NOS (ang. *nitric oxide synthase*) - syntaza tlenku azotu

nNOS (ang. *neuronal NOS*) - neuronalna syntaza tlenku azotu

OCT (ang. *optical coherence tomography*) - optyczna tomografia koherencyjna

pPCI (ang. *primary percutaneous coronary intervention*) - pierwotna angioplastyka wieńcowa

ROC (ang. *receiver operating characteristic*) - krzywa oceny jakości klasyfikatora

SDMA (ang. *symmetric dimethylarginine*) - symetryczna dimetyloarginina

STEMI (ang. *ST elevation myocardial infarction*) - zawał mięśnia sercowego z uniesieniem odcinka ST

TCFA (ang. *thin-cap fibroatheroma*) - cienka czapeczka włóknista

UPLC-MS/MS (ang. *ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*)  
ultraszybka chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas

### 3. Wprowadzenie

#### 3.1. Metabolizm argininy

L-arginina (kwas 2-amino-5-guanidynowalerianowy) jest endogennym aminokwasem zasadowym budującym białka organizmu, a także prekursorem dla szeregu istotnych funkcjonalnie związków (Rycina 1). Jej egzogennym źródłem jest dieta białkowa a endogennym biosynteza lub wewnątrzkomórkowa degradacja białek [1]. Połowa argininy zawartej w diecie jest wchłaniana do krwioobiegu, reszta ulega rozkładowi w jelicie cienkim [2, 3]. U dorosłego człowieka 5-15% puli argininowej powstaje endogennie z cytruliny w jelitach, nerkach i wątrobie. Substratami dla jelitowej biosyntezy cytruliny są głównie glutamina i glutaminian. Większość, około 80% cytruliny powstałej w enterocytach, jest transportowana do nerek, gdzie w kanalikach proksymalnych jest przekształcana do argininy i uwalniana do krwioobiegu. Pozostała pula jelitowej cytruliny trafia do wątroby i jest włączana do cyklu mocznikowego, w którym jest przekształcana do argininy [3, 4, 5]. Wewnątrzkomórkowa biosynteza argininy w komórkach produkujących NO ma znaczenie drugorzędne [5, 6].

Katabolizm L-argininy zachodzi w kilku złożonych szlakach metabolicznych, które mogą jednocześnie funkcjonować obok siebie w tej samej komórce. Zazwyczaj jednak ekspresja enzymów biorących udział w metabolizmie argininy jest tkankowo i/lub narządowo zróżnicowana. Zasadnicza pula argininy jest metabolizowana przez konkurujące o nią arginazę i syntazę tlenku azotu (NOS, ang. *nitric oxide synthase*) [1]. Trzy izoformy NOS przekształcają L-argininę do L-cytruliny i tlenku azotu (NO, ang. *nitric oxide*). Izoformy konstytutywne, neuronalna (nNOS, ang. *neuronal NOS*) i śródbłonkowa (eNOS, ang. *endothelial NOS*) są obecne w niektórych tkankach, natomiast forma indukowalna (iNOS, ang. *inducible NOS*) występuje w większości tkanek [7]. Z kolei dwa typy arginazy – enzymu cyklu mocznikowego – katalizują przemianę L-argininy do L-ornityny i mocznika, przede

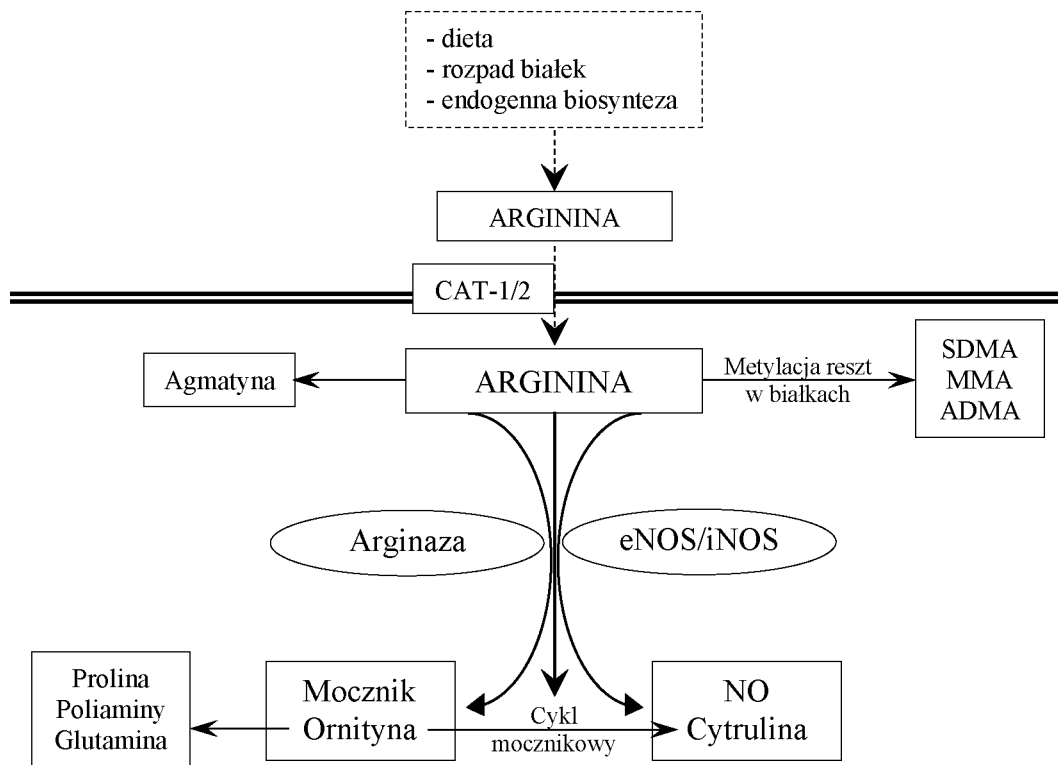


wszystkim w wątrobie i jelitach [8, 9]. W warunkach fizjologicznych stężenia L-argininy potrzebne do osiągnięcia maksymalnej aktywności NOS są 1000-krotnie niższe niż dla arginazy, niemniej jednak szybkość reakcji NOS jest 1000 razy mniejsza niż arginazy, co sprawia, że wydajność obu enzymów jest porównywalna, a jej zachwianie wynikające ze zmiany stężenia argininy, niedoboru kofaktora NOS tetrahydrobiopteryny (BH<sub>4</sub>, ang. *tetrahydrobiopterin*), obecności inhibitorów NOS lub arginazy czy różnych procesów patologicznych ingerujących na poziomie ekspresji łatwo prowadzi do zaburzenia równowagi pomiędzy oboma enzymami [8].

Pomimo iż stężenie wewnątrzkomórkowe argininy jest od 4 do 20 razy wyższe aniżeli zewnątrzkomórkowe, to synteza NO w śródbłonku naczyniowym zależy od tego drugiego. Zjawisko to nazwano *paradoksem argininowym*, który wiąże się z lokalizacją na powierzchni błony komórkowej białka nośnikowego CAT-1 (ang. *cationic amino acid transporter 1*) odpowiedzialnego za transport argininy w kompleksie z eNOS [10, 11]. Taki układ promuje powstawanie NO z argininy pozakomórkowej. Asymetryczna dimetyloarginina (ADMA, ang. *asymmetric dimethylarginine*) będąca inhibitorem NOS ma silne powinowactwo z receptorem CAT-1 oraz indukowanym receptorem CAT-2 [12]. Wysokie osoczowe stężenie ADMA przy fizjologicznym poziomie L-argininy wiąże się ze spadkiem aktywności NOS i produkcji NO. W takiej sytuacji suplementacja egzogennej L-argininy wypierającej kompetycyjnie ADMA z NOS może przywrócić jej prawidłową aktywność [10].

Ornityna powstająca z argininy pod wpływem arginazy jest substratem do produkcji poliamin niezbędnych do regulacji procesów proliferacji i różnicowania komórek, proliny uczestniczącej w syntezie kolagenu oraz glutaminy będącej prekursorem neuroprzekaznika GABA [1, 13]. Pod wpływem dekarboksylazy argininowej, L-arginina przekształcana jest do agmatyny, związku hamującego NOS i syntezę poliamin. Z kolei metylacja reszt argininowych łańcuchów białkowych z ich następowym rozpadem prowadzi do produkcji

ADMA i mono-metylargininy (MMA, ang. *N-monomethyl-L-arginine*) hamujących NOS oraz symetrycznej dimetyloargininy (SDMA, ang. *symmetric dimethylarginine*) hamującej dokomórkowy transport argininy [14].



Rycina 1. Metabolizm argininy.

Objaśnienia: NO: tlenek azotu, eNOS/iNOS: śródbłonkowa/indukowalna syntaza tlenu azotu, CAT: kationowy transporter aminokwasowy, SDMA: symetryczna dimetyloargininy, MMA: mono-metylarginina, ADMA: symetryczna dimetyloargininy.

### 3.2. Metabolizm argininy a proces miażdżycy

Większość badań dotyczących metabolizmu argininy u ludzi ocenia jego zaburzenia w sposób pośredni w oparciu o stężenie substratów i produktów związanych z poszczególnymi szlakami metabolizmu argininy [15-17]. Zmiany w biodostępności argininy oraz w proporcjach argininy i jej metabolitów mają znaczenie prognostyczne. Wykazano, że zmniejszona globalna biodostępność argininy (GABR, ang. *global arginine bioavailability*)

przy niezmnieszonym stężeniu samej argininy związana była ze zwiększonym prawdopodobieństwem występowania odległych zdarzeń sercowo-naczyniowych [15, 16, 18]. Z kolei proporcja stężenia argininy do ADMA umożliwia ocenę biodostępności argininy do produkcji NO zależnej od obecności inhibitora NOS [14], a jej kliniczne znaczenie było oceniane u pacjentów z niewydolnością serca, nadciśnieniem tętniczym, miażdżycą oraz poważnymi zdarzeniami sercowo-naczyniowymi [15, 16, 19].

Dysfunkcja śródbłónka poprzedza objawowy lub bezobjawowy etap miażdżycy, a jej cechą rozpoznawczą jest zaburzona zdolność do endogennej wazorelaksacji, wynikająca głównie z rozprężenia eNOS. Upośledzenie wazodylatacji związane jest m.in. z nadmierną produkcją wolnych rodników, zwiększoną ekspresją molekuł adhezyjnych czy degradacją glikokaliksu komórek śródbłónka. Te niekorzystne zmiany prowadzą do zwiększonej przepuszczalności śródbłónka, zwiększonej krzepliwości, aktywacji płytek krwi oraz nasilonej interakcji śródbłónek-leukocyt z następującą rekrutacją monocytów do intymy [20, 21]. Wymienione procesy zazwyczaj poprzedzają proliferację fibroblastów w obrębie intymy, prowadząc do tworzenia blaszki włóknistej [22].

Liczne doniesienia próbują powiązać osoczowy poziom ADMA z dysfunkcją śródbłónka i ze schorzeniami sercowo-naczyniowymi. Podwyższone wartości ADMA odnotowano m.in. u pacjentów z hipercholesterolemią. Z kolei w modelach zwierzęcych powiązано zwiększoną aktywność arginazy ze zmianami miażdżycowymi. Myszy z wyłączonymi genami dla apolipoproteiny E (apoE<sup>-/-</sup>) karmione dietą bogatocholesterolową miały istotnie wyższą aktywność arginazy w aorcie niż myszy typu dzikiego w tym samym wieku [23, 24]. Wykazano, że aktywność arginazy jest również zwiększona wśród królików ze zmianami miażdżycowymi w aorcie oraz z hiperlipidemią [25]. Zwiększona aktywność arginazy została również wykryta w makrofagach, które pełnią kluczową rolę w inicjacji oraz progresji miażdżycy [26-29]. Arginaza może odgrywać istotną rolę w hiperplazji intymy

i procesach przebudowy ściany tętnicy poprzez zwiększoną produkcję poliamin i L-proliny, które umożliwiają proliferację komórek mięśni gładkich naczyń i odkładanie macierzy pozakomórkowej [30, 31].

### **3.3. Metabolizm argininy w ostrym zespole wieńcowym**

Indukowany niedokrwieniem i reperfuzją naciek komórek zapalnych we wczesnej fazie zawału mięśnia sercowego (MI, ang. *myocardial infarction*) wiąże się ze zwiększoną aktywnością iNOS. Z kolei do wydajnej syntezy NO oprócz substratu eNOS wymaga obecności BH<sub>4</sub>, którego dostępność w trakcie ostrego niedokrwienia miokardium spada. Wówczas dochodzi do rozprężenia eNOS i zwiększenia produkcji reaktywnych form tlenu kosztem NO.

Bezpośrednia aktywność arginazy w trakcie ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego oceniana była w modelach zwierzęcych. Zaobserwowano, iż wczesną reakcją na stres hipoksemiczny jest indukcja ekspresji oraz wzrost aktywności arginazy I [32]. Ponadto badania eksperymentalne wskazują, że ekspresja arginazy I w obszarach objętych niedokrwieniem i reperfuzją jest wyższa w stosunku do pozostałych regionów tkanki mięśnia sercowego [33]. Jest ona związana ze zwiększoną naczyniową produkcją anionu nadadtlenkowego i/lub zmniejszoną produkcją śródbłonkowej BH<sub>4</sub> lub L-argininy, które powodują zmniejszoną produkcję NO [34, 35]. Stwierdzono także zwiększoną ekspresję arginazy bezpośrednio po uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym w komórkach śródbłonka tętnic wieńcowych oraz mięśniówki gładkiej [4, 9]. W modelu niedokrwienia/reperfuzji serca szczura udowodniono, że zwiększona aktywność arginazy zapoczątkowana jest przez rozprężenie eNOS w ciągu 2 h od początku reperfuzji oraz podtrzymywana jest przez indukcję zależnej od TNF-alfa arginazy-1 oraz zahamowanie eNOS [36]. McQuillan i wsp. udowodnili, że w trakcie niedotlenienia ekspresja eNOS była zredukowana o 40-60% w komórkach śródbłonka przez przynajmniej 48 godzin [37].

Zaburzenia metabolizmu NO związane z uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym, mogą towarzyszyć zjawisku no-reflow i sprzyjać poszerzaniu się strefy zawału [38].

W badaniach eksperymentalnych przeprowadzonych na hodowlach komórek śródbłonka ekspozycja na niedotlenienie prowadziła do zwiększonego stężenia L-argininy wewnątrz komórek, uwalnianej z zasobów komórek lub z proteolizy białek [39]. Z kolei depolaryzacja błony komórek śródbłonka powodowała upośledzone wchłanianie L-argininy [40]. Pomimo zwiększonego stężenia argininy wewnątrz- i zewnątrzkomórkowo w trakcie uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego stawała się ona niedostępna jako substrat do produkcji NO z powodu uszkodzenia śródbłonka naczyniowego.

### **3.4. Metabolizm argininy jako cel terapeutyczny**

Teoretycznie, interwencja w szlaki metabolizmu argininy prowadząca finalnie do zwiększonej produkcji NO powinna być korzystna w przypadku schorzeń sercowo-naczyniowych. W zwierzęcym modelu MI u szczurów ogólnoustrojowe zahamowanie arginazy było związane ze wzrostem stężenia cytruliny, wskaźnika cytrulina/arginina, cytrulina/ornityna oraz spadku poziomu ornityny. Co więcej, wykazano, że zahamowanie arginazy wiąże się ze zmniejszonym obszarem martwicy o 50% w mechanizmie zależnym od wzrostu aktywności NOS oraz biodostępności NO [4]. Podobnie miejscowy, dowieńcowy wlew inhibitora arginazy rozpoczęty 5 minut przed reperfuzją w modelu MI u świni redukuje strefę martwicy o 50% [41]. Również wlew L-argininy oraz tetrahydrobiopteryny 5 minut przed reperfuzją zmniejszał strefę zawału u szczurów i świń. Ten efekt był zależny od NOS i wiązał się ze zmniejszoną produkcją nadtlenków [42]. Pomimo tego, że istnieje szereg specyficznych inhibitorów arginazy ich ogólnoustrojowe działanie jest głównym ograniczeniem dla tej terapii wśród ludzi [2]. Suplementacja argininy jest drugim potencjalnym sposobem ingerencji w metabolizm argininy, niemniej wyniki dostępnych badań są niejednoznaczne. Część badań, w tym dane z VINTAGE MI wykazały zwiększoną

śmiertelność związaną z suplementacją argininy w okresie po MI [43]. Z drugiej strony w badaniu eksperymentalnym na szczurach i świnich po zastosowaniu wlewu dożylnego L-argininy oraz BH4 5 minut przed reperfuzją obserwowano redukcję strefy zawału, a efekcie temu pośredniczyły szlaki zależne od NOS, co skutkowało zmniejszoną produkcją reaktywnych form tlenu [44]. Konieczne są dalsze badania, aby ustalić czy interwencja w szlaki metaboliczne argininy może być klinicznie efektywna.

#### **4. Hipoteza i cel**

Postuluję, iż w ostrej fazie MI u człowieka w porównaniu z warunkami stabilnymi metabolizm argininy jest przesunięty w kierunku arginazy kosztem syntazy tlenu azotu. Zakładam, że w ostrej fazie MI ta względnie zwiększona aktywność arginazy, wyrażona w postaci zaburzonej równowagi metabolitów argininy, wiąże się ze zwiększonym obszarem uszkodzenia miokardium a także może mieć związek z niekorzystną morfologią zmiany odpowiedzialnej za MI. Zakładam także, że utrzymująca się w obserwacji odległej zwiększona aktywność arginazy wiąże się z większym ładunkiem blaszki miażdżycowej w stabilnym segmencie tętnicy dozwłowej przylegającej proksymalnie i dystalnie do blaszki ranliwej. Zakładam, że zwiększona aktywność arginazy w okresie pozawałowym może mieć związek z niekorzystnymi, klinicznymi zdarzeniami sercowo-naczyniowymi.

#### **Cele pracy:**

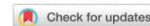
1. Ocena stężenia metabolitów argininy w ostrej fazie zawału mięśnia sercowego i w obserwacji odległej i na tej podstawie oszacowanie przesunięć w metabolizmie argininy u człowieka.
2. Powiązanie zmian w metabolizmie argininy ze stopniem uszkodzenia miokardium.
3. Powiązanie zmian w metabolizmie argininy ze zmianami w błonie wewnętrznej i środkowej zarówno zmiany niestabilnej jak i przylegającego do niej stabilnego regionu.
4. Zbadanie związku pomiędzy zmianami w metabolizmie argininy a rokowaniem klinicznym.

Do sprawdzenia hipotezy drugiej wybrano populację pacjentów z MI wiążącym się z możliwością wystąpienia dużej strefy uszkodzenia miokardium, często z zawałem ściany przedniej. Z kolei dla sprawdzenia hipotezy trzeciej wybrano zawały o zróżnicowanej lokalizacji, typowej dla populacji ogólnej.

## **5. Publikacje wchodzące w skład dysertacji**

5.1. Publikacja 1: *„The shifted balance of arginine metabolites in acute myocardial infarction patients and its clinical relevance”*





## OPEN The shifted balance of arginine metabolites in acute myocardial infarction patients and its clinical relevance

Patrycja Molek<sup>1</sup>, Paweł Zmudzki<sup>2</sup>, Aleksandra Włodarczyk<sup>1</sup>, Jadwiga Nessler<sup>1</sup> & Jarosław Zalewski<sup>1</sup>✉

The arginine metabolism as a target for cardioprotection in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) remains insufficiently understood. Arginine, ornithine, citrulline, asymmetric dimethylarginine (ADMA) and proline plasma levels were measured using liquid chromatography and tandem mass spectrometry in 70 consecutive STEMI patients upon admission and at 6-month follow-up and were compared with left ventricular function, volumes, and infarct characteristics determined by cardiac magnetic resonance imaging, and with 5-year clinical outcomes. Baseline median concentration of arginine was higher by 49% ( $P = 0.002$ ) when compared to 6-month measurements and was correlated with an ischemia risk area ( $R = 0.34$ ,  $P = 0.004$ ) and infarct size ( $R = 0.33$ ,  $P = 0.006$ ). Following ischemia median citrulline/arginine index decreased when compared with 6-month result ( $P = 0.002$ ), while citrulline/ornithine and arginine/ADMA ratios maintained unchanged indicating a shift of arginine metabolism from nitric oxide synthase (NOS) towards arginase. The 6-month arginine concentration reached the area under the ROC curve of 0.67 (95% confidence interval 0.54–0.81) for prediction of death, myocardial infarction or heart failure hospitalization and its value of  $< 29 \mu\text{M}$  was associated with lower event free survival ( $P = 0.02$ ). In STEMI patients, during ischemia conversion of elevated plasma arginine was shifted from NOS towards arginase. Decreased 6-month arginine concentrations were associated with worse long-term outcomes.

Arginine is both a substrate for arginase and the sole source for nitric oxide (NO) synthesis by three main isoforms of NO synthases (NOS)<sup>1–4</sup>. Competing of both enzymes for the same L-arginine may lead to diminished production of an unstable molecule of NO which undergoes non-enzymatic oxidation to nitrite and finally to stable nitrate. In stable conditions endothelial NOS produces majority of NO, however changes in NO and L-citrulline levels may also reflect activation of inducible NOS especially in response to hypoxia or cardiac injury and non-enzymatic NO formation<sup>5</sup>. It has been demonstrated that NO synthesis is not exclusively attributed to the vascular endothelium but also red blood cells express a functional endothelial NOS and constitutively produce NO<sup>6,7</sup> and contribute to the regulation of systemic blood pressure and nitrite homeostasis<sup>8</sup>. Apart from NOS and arginase, arginine is a substrate for arginine decarboxylase that synthesize L-arginine linked directly to polyamine metabolism or for arginine:glycine amidinotransferase producing ornithine, guanidinoacetate and L-homoarginine<sup>9</sup>. In turn, asymmetric dimethylarginine (ADMA) is derived from the methylation of arginine residues of various proteins and acts as an endogenous NOS inhibitor.

There is evidence that endothelial damage following ischemia/reperfusion (I/R) injury is a component of no-reflow phenomenon and favors infarct area expansion<sup>10</sup>. Kloner et al. showed that structural changes in coronary microcirculation were preceded by and limited to the areas of irreversible cardiomyocyte injury<sup>11</sup>, and were substrate for intramyocardial hemorrhage<sup>12</sup>. The endothelial damage is associated with impaired endothelial-dependent vasodilatation and diminished NO bioavailability<sup>13</sup>. In cultured endothelial cells, exposure to hypoxia leads to an increased intracellular concentration of L-arginine released from cellular storages or protein proteolysis<sup>14</sup> whereas impaired uptake of L-arginine is a consequence of plasma membrane depolarization<sup>15</sup>.

<sup>1</sup>Department of Coronary Disease and Heart Failure, Jagiellonian University Medical College, 80 Pradnicka Street, 31-202 Krakow, Poland. <sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland. ✉email: jarekzmd@interia.pl

Although intra- and extracellular arginine concentration was elevated during I/R, it was inaccessible for NO production due to endothelial damage.

Diminished arginine bioavailability and its dysfunctional metabolism have been shown to be associated with increased cardiovascular risk. Reduced global arginine bioavailability ratio (GABR), but not arginine concentration, was associated with both higher prevalence of coronary artery disease (CAD) and an increased incidence of long-term cardiovascular events<sup>16–18</sup>. Moreover, patients who presented symptoms of cardiogenic shock following MI had plasma levels of arginine that were twice as low, along with a 42% lower GABR when compared with stable CAD patients<sup>19</sup>. Recent studies on red blood cells provide evidence that their endothelial NOS activity is compromised in patients with coronary artery disease<sup>7</sup> while elevated arginine I activity in patients with type 2 diabetes is associated with induction of endothelial dysfunction<sup>20</sup>.

In animal model of myocardial infarction (MI) a systemic inhibition of arginase was associated with an increase of plasma citrulline, citrulline/arginine ratio and citrulline/ornithine ratio and a decrease of plasma ornithine<sup>21</sup>. Simultaneous assessment using two ratios of citrulline/ornithine and citrulline/arginine provided indirect insight pertaining to the balancing activity of NOS and arginase. In turn, an arginine/ADMA ratio provided information about arginine availability for NO production dependent on NOS inhibitor<sup>22</sup> and was identified as a marker of heart failure<sup>23</sup>, hypertension<sup>24</sup>, atherosclerosis<sup>25</sup> and of major cardiovascular events<sup>26</sup>. In contrast, a nitrate anion as a dietary element that can be reduced via nitrite into NO does not reflect NO availability<sup>27</sup>. Lauer et al.<sup>28</sup> have shown that plasma nitrite, but not nitrate correlated with NO production from endothelial NOS in humans. Additionally, in patients with increased cardiovascular risk, there is a decreased availability of tetrahydrobiopterin which results in an endothelial NOS-dependent formation of superoxide instead of NO and promotes the oxidation of NO to nitrate<sup>29</sup>.

To date an unclear role of arginine metabolism in acute MI precluded the development of effective arginine-based cardioprotective therapies. We hypothesize that in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) elevated plasma arginine together with its metabolites released following ischemia from damaged cardiac myocytes may reflect myocardial and microvascular injury, a shifted metabolic balance between NOS and arginase and potentially might be useful in prediction of clinical outcomes.

## Methods

**Patients.** Seventy consecutive STEMI patients who underwent primary percutaneous coronary intervention (PCI) were enrolled. They qualified for inclusion if presented with chest pain duration at rest no longer than 12 h with concomitant ST-segment elevation > 1 mm in 2 or more limb leads or > 2 mm in 2 precordial leads, or if revealed a new left bundle branch block. Criteria for exclusion included lack of informed consent, the presence of cardiogenic shock or pulmonary edema, history of MI or PCI at the same location or coronary artery bypass surgery, history of cancer, venous thromboembolism, renal or liver failure, and contraindications of cardiac magnetic resonance (CMR) imaging.

The demographic characteristics, anthropometric parameters, cardiovascular risk factors, history of cardiovascular diseases and comorbidities were collected for all patients. Upon admission, hemoglobin, hematocrit, red and white blood cell count, platelet count, lipid profile, glucose, creatinine, high sensitivity C-reactive protein and fibrinogen were determined using standard laboratory techniques. Serum activity of creatine kinase (CK, IU/L), isoenzyme MB of creatine kinase (CK-MB, IU/L) as well as concentration of cardiac high sensitivity troponin T (ng/ml) were measured upon admission and then subsequently at 8, 16, 24 and 48 h. Diagnosis of diabetes mellitus was derived from patient history. A new diabetes mellitus diagnosis was given based upon hyperglycemic presentation at intake or after a glucose tolerance test. Chronic kidney disease was diagnosed when creatinine clearance using the Cockcroft-Gault formula was calculated to be lower than 60 ml/min.

The study was approved by the Ethics Committee of Jagiellonian University and all methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. All study participants provided written informed consent prior to their inclusion to the study procedures.

**Quantification of arginine metabolites.** Blood samples were drawn into citrate tubes upon admission in acute phase of MI before PCI and again, 6 months later. Before 6-month follow-up visit all patients were on low-nitrate/nitrite diet for three days. The samples were centrifuged at 2,500 g at 18 °C to 22 °C for 20 min and processed immediately or stored in aliquots at – 80 °C until analysis. Plasma proteins for amino acid analysis were precipitated with 80% methanol before measurements were recorded. Plasma concentrations of arginine, ornithine, citrulline, proline, ADMA and nitrite/nitrate (NO<sub>x</sub>) were measured in duplicates using ultra-performance liquid chromatography—tandem mass spectrometer (UPLC-MS/MS) with Waters ACQUITY UPLC (Waters Corporation, Milford, MA, USA) coupled to a Waters TQD mass spectrometer (electrospray ionization mode ESI-tandem quadrupole).

NO<sub>x</sub> measurement procedure was performed in two ways<sup>30</sup>. For nitrites the procedure included direct derivatization to azo compound—4-((4-((2-aminoethyl)amino)naphthalen-1-yl)diazonyl)benzenesulfonamide, which was later quantified using the developed UPLC-MS/MS procedure. The procedure for nitrates included two stages of enzymatic reduction to nitrites and subsequent derivatization to azo compound and quantification as above described. Procedures in plasma samples were performed in parallel, and the final content of nitrates was calculated based upon the difference between values obtained from both procedures since the second procedure simultaneously quantifying nitrites and nitrates within the sample. Chromatographic separations were carried out using Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column, 2.1 × 100 mm, and 1.7 μm particle size equipped with Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> VanGuard pre-column. The column was maintained at 40 °C and eluted under the following conditions: linear gradient elution from 100 to 20% of eluent A over a 4 min timeframe, followed by isocratic elution from 20% of eluent A over 2 min, and linear gradient elution from 20 to 100% of eluent A over 1 min at a flow rate

of 0.3 mL/min (Eluent A: water/formic acid (0.1%, v/v); eluent B: acetonitrile/formic acid (0.1%, v/v). 10  $\mu$ L of each sample was injected in triplicate.

Chromatographic separations of amino acids were carried out with the Acquity UPLC BEH Amide column, 2.1  $\times$  100 mm, and the 1.7  $\mu$ m particle size equipped with VanGuard Acquity UPLC BEH Amide pre-column. The column was maintained at 40 °C and eluted under linear gradient elution from 20 to 35% of eluent A over 4 min followed by linear gradient elution from 35 to 40% of eluent A over 6 min, with a flow rate of 0.3 mL/min. (Eluent A: water/formic acid (0.1%, v/v); eluent B: acetonitrile/formic acid (0.1%, v/v)).

Waters' TQD mass spectrometer parameters were optimized for quantitative analysis using the solutions of L-arginine, N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimethylarginine, L-citrulline, L-ornithine, L-proline, 4-((4-((2-aminoethyl)amino)naphthalen-1-yl)diazanyl)benzenesulfonamide, and chloramphenicol in concentration 10  $\mu$ g/mL at flow 20  $\mu$ L/min and mixture of eluent A and B 1:1 (v/v) at flow 0.28 mL/min.

**Coronary angiography.** Coronary angiograms were acquired with Axiom Artis dFC (Siemens, Erlangen, Germany) and were analyzed offline using two contralateral projections for each artery before and after angioplasty. All coronary segments were evaluated for the presence of visible thrombus in the epicardial artery, distal embolization during and after primary PCI as well as degree of stenosis based on visual inspection. Epicardial segments with coronary lesions with at least 50% narrowing were considered significant. Epicardial blood flow in the infarct-related artery (IRA) was evaluated using the TIMI scale<sup>31,32</sup>.

**Left ventricular volumes, function and infarct characteristics.** CMR imaging was performed using a 1.5-T scanner (Magnetom Sonata Maestro Class, Siemens, Erlangen, Germany) at baseline, between the 2nd and the 4th day following primary PCI, and then again, at 6 months, as previously described<sup>33</sup>. Briefly, using ECG gating technique, left ventricular (LV) function was assessed with cine imaging in a spoiled gradient echo sequence. Following cine sequences, imaging of myocardial edema reflecting area at risk (AAR) of ischemia was performed using the breathhold, T2-weighted sequence. Then, the late-enhancement imaging was performed 10 to 20 min after contrast injection of 0.1 mmol/kg of gadobutrolum (Gadovist, Bayer Pharma AG, Germany) with a gradient echo readout. The entire left ventricle was covered by contiguous, short-axis oriented 8-mm slices in all CMR techniques.

An in-house-developed, vendor-independent, cardiac-dedicated software (CardioViewer, baseline version, Catholic University Leuven, Leuven, Belgium)<sup>34</sup> was used for blinded analysis of all images. The borders of endocardium and epicardium were delineated on images with the largest and smallest LV volumes in order to determine end-diastolic and end-systolic LV volumes, respectively. Based on LV volumes measurements, LV ejection fraction and myocardial volumes were calculated. The myocardial edema, infarct size (IS), and microvascular obstruction (MVO) were delineated on T2-weighted as well as late gadolinium-enhanced images, respectively. The area of delineation multiplied by the thickness of the slice and by the myocardial tissue density (1.05 g/ml) served as formula to calculate the mass of AAR, IS and MVO. The AAR was expressed as the ratio of LV mass. The hyper-enhanced area of the infarct was expressed using a ratio of myocardial edema or LV mass, while MVO was expressed using a ratio of the infarct area.

**Long-term clinical follow-up.** Death, recurrent MI confirmed by enzyme release, stroke, or hospitalization due to heart failure (HF) decompensation were collected within 5-year follow-up at the outpatient clinic. Data was supplemented by an in-person or telephone interview with the patient or in the case of death, data was obtained through an immediate relative. Ischemic symptoms were assessed according to the Canadian Cardiovascular Society (CCS) scale. The HF hospitalization was defined as an episode of cardiac decompensation, including pulmonary edema or worsening of dyspnea up to at least class III-IV according to the New York Heart Association (NYHA) classification requiring hospital admission.

**Statistical analysis.** To demonstrate a 10% relative decrease of arginine concentration during 6-month follow-up with a 90% power and a standard deviation of 20% using a P value of 0.05, 67 patients were required in the whole group.

Statistical analyses were performed with SPSS Statistics software (Version 25.0.0.2, IBM, USA) as previously<sup>33</sup>. Categorical variables are shown as numbers (percentages) and compared by Fisher's exact test. Continuous variables are shown as median (interquartile range). Continuous variables with normal distribution were compared by Student t test whereas non-normally distributed with the Mann-Whitney U test. Between two time-points normally distributed variables were compared with t test for paired samples or in case of non-normal distribution with the Wilcoxon signed-rank. The correlation of two normally distributed variables was calculated with the Pearson test whereas for non-normal distributed data Spearman rank correlation coefficient was performed. Receiver operating characteristic (ROC) curves and the Youden index were used to determine the optimal cut-off value of arginine or NO<sub>x</sub> and their sensitivity and specificity in prediction of death, recurrent MI or HF requiring hospitalization. A log-rank test was computed to evaluate differences in survival free of death, recurrent MI or HF requiring hospitalization between patients with estimated cut-off values of arginine or NO<sub>x</sub> concentration. Finally, all independent variables with the potential for confounding both the outcome and exposure were included in the Cox proportional hazard regression to find predictors of long-term death, recurrent MI or HF requiring hospitalization. A two-tailed P value of less than 0.05 was statistically significant.

	All patients, n = 70
Age	59.0 (50.8, 64.3)
Male gender	54 (77)
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	26.3 (24.5, 29.0)
Anterior wall myocardial infarction	52 (74)
Killip class > 1 on admission	6 (8.5)
<b>Cardiovascular risk factors</b>	
Hypertension	35 (50)
Diabetes mellitus	11 (16)
Dyslipidemia	44 (63)
Current smoking	40 (57)
Family history of coronary artery disease	13 (19)
Chronic kidney disease	0
<b>Comorbidities</b>	
Prior myocardial infarction	2 (3)
Prior percutaneous coronary intervention	0
History of stroke	0
History of peripheral vascular disease	1 (1.4)
Pre-infarction angina	10 (14)
<b>Laboratory results upon admission</b>	
Hemoglobin, g/dL	14.6 (13.7, 15.4)
Hematocrit, %	42.6 (40.3, 45.8)
Platelets, × 10 <sup>3</sup> /μL	218 (187, 260)
White blood cells, × 10 <sup>3</sup> /μL	11.5 (9.6, 13.9)
Glucose, mmol/L	8.1 (7.0, 9.5)
Creatinine, μmol/L	92.0 (80.5, 105.5)
High sensitivity C-reactive protein, mg/dL	1.50 (1.12, 4.09)
Fibrinogen, mg/dL	3.31 (3.03, 3.88)
Total cholesterol, mmol/L	5.48 (4.91, 6.36)
LDL cholesterol, mmol/L	3.39 (2.75, 4.15)
HDL cholesterol, mmol/L	1.07 (1.02, 1.28)
Triglycerides, mmol/L	1.01 (0.9, 2.02)
Troponin T, ng/mL	0.041 (0.014, 0.147)
Isoenzyme MB of creatine kinase, IU/L	20 (15, 34)
Area under the curve of isoenzyme MB of creatine kinase release within 48 h of myocardial infarction, IU/L × h	3525 (2222, 5625)
<b>Antithrombotic treatment before admission</b>	
Aspirin, loading dose of 300 mg p.o	67 (96)
Clopidogrel, loading dose of 600 mg p.o	44 (62.9)
Unfractionated heparin, loading dose of 5000 IU i.v	39 (56)
<b>Treatment at discharge</b>	
Aspirin	70 (100)
Clopidogrel	55 (78.6)
Ticagrelor	15 (21.4)
ACEI or ARB	66 (94)
Beta-blocker	65 (93)
Statin	70 (100)

**Table 1.** Baseline characteristics. Data are shown as median (interquartile range) or number (percentage). ACEI angiotensin-converting-enzyme inhibitors, ARB angiotensin receptor blockers, LDL low-density lipoprotein, HDL high-density lipoprotein.

## Results

Baseline clinical and laboratory characteristics are reported in Table 1. The studied cohort consisted mostly of middle-aged men. About one-sixth of patients were diabetic and half were hypertensive or active smokers. At baseline, the majority of patients were in Killip class 1 and three-fourths had an anterior STEMI. The median time of ischemia was 220 (interquartile range 160 to 350) minutes. At initial contrast injections, occluded IRA with TIMI 0 or 1 flow was found in 63 (90%) patients whereas after the procedure TIMI 2 or 3 flow was restored in 69 (98.6%) patients. A collateral blood flow was scored from 0 to 3 according to the Rentrop classification and

	Acute phase of MI	6-month follow-up	P value
<b>Left ventricular volumes and function</b>			
Left ventricular end-diastolic volume, ml	169 (146, 198)	179 (148, 227)	0.11
Left ventricular end-diastolic volume index, ml/m <sup>2</sup>	89 (78, 103)	94 (80, 114)	0.14
Left ventricular end-systolic volume, ml	96 (78, 120)	95 (64, 141)	0.82
Left ventricular end-systolic volume index, ml/m <sup>2</sup>	51.5 (41, 64)	50 (35, 74)	0.89
Stroke volume, ml	73 (59, 84)	81 (70, 82)	0.005
Stroke volume index, ml/m <sup>2</sup>	39 (30, 45)	42 (38, 48)	0.005
Left ventricular ejection fraction, %	42 (36, 48)	44 (35, 54)	0.12
<b>Infarct characteristics</b>			
Left ventricular mass, g	144 (125, 172)	134 (105, 151)	0.011
Left ventricular mass index, g/m <sup>2</sup>	75 (68, 86)	70 (57, 78)	0.003
Area at risk, g	73 (49, 883)	NA	
Area at risk/left ventricular mass	0.51 (0.37, 0.60)	NA	
Infarct size, g	47 (24, 68)	31 (13, 45)	<0.001
Infarct size/area at risk	0.65 (0.51, 0.79)	NA	
Infarct size/left ventricular mass	0.34 (0.19, 0.43)	0.21 (0.11, 0.28)	<0.001
Present microvascular obstruction	54 (77.1)	NA	
Microvascular obstruction, g	3.45 (0.45, 10.60)	NA	
Microvascular obstruction/infarct size	0.09 (0.02, 0.19)	NA	
Microvascular obstruction/area at risk	0.05 (0.01, 0.13)	NA	

**Table 2.** Left ventricular volumes, function and infarct characteristics. Data are shown as median (interquartile range). MI myocardial infarction, NA not applicable.

was detected in 47 (67.1%), 14 (20%), 7 (10%) and 2 (2.9%) of subjects, respectively. An aspiration thrombectomy was used in 56 (80%) patients and the procedure was completed in all cases using drug eluting stent implantation. Clinical management and medical treatment, including antithrombotic therapy, were accomplished according to the most recent guidelines.

**Left ventricular morphology, function and infarct characteristics.** The median time interval between STEMI and first CMR was 3 (2–4) days and between the first and second CMR was 6 (5.5–6.5) months. There were no significant differences in LV end-diastolic or end-systolic volumes and LV ejection fraction between baseline and follow-up (Table 2). During follow-up, stroke volume improved ( $P=0.005$ ) and LV mass decreased ( $P=0.011$ ).

Median AAR was 51% of left ventricle. The IS expressed as the ratio of LV mass significantly decreased from median baseline value of 0.34 to 0.21 after 6 months ( $P<0.001$ ). The MVO was detected in 54 of 70 patients, and among these subjects, median MVO extent was 8% of IS (Table 2).

**The shifts in balance of arginine metabolites in acute phase of MI.** Baseline median concentration of arginine was significantly higher by 49% ( $P=0.002$ ), ADMA by 42% ( $P=0.032$ ) and NO<sub>x</sub> by 28% ( $P<0.001$ ) when compared to 6-month follow-up results. However, there were no significant differences between baseline and follow-up concentrations of ornithine, citrulline and proline (Table 3).

There were significant correlations between arginine, ornithine and citrulline both on admission as well as 6 months following MI (Supplementary Table S1). Six months following MI but not in acute phase, we found significant correlations between NO<sub>x</sub> level versus arginine, ornithine and citrulline.

There were no significant differences between baseline and follow-up ratios of citrulline/ornithine and arginine/ADMA whereas citrulline/arginine ratio was lower ( $P=0.002$ ) when compared with 6-month results (Fig. 1).

In acute phase of MI, arginine concentration correlated with fibrinogen and inversely correlated with creatinine and urea (Supplementary Table S2). Simultaneously, ADMA was inversely correlated with creatinine while ornithine and proline were associated with hemoglobin and hematocrit.

**Arginine metabolites and I/R injury.** Arginine, ornithine and citrulline upon admission were associated with peak CK-MB release 8 h following PCI (Supplementary Table S3). There was no significant relationship between the concentration of arginine and its metabolites when measured upon admission versus time of ischemia as well as pre- and post-PCI TIMI flow. The concentration of arginine, ornithine, citrulline, proline and ADMA was significantly higher in patients with left anterior descending artery as an IRA compared with the remainder (for all  $P<0.001$ ). An association was found between collateral blood flow to the IRA classified by Rentrop scale versus arginine ( $R=0.26$ ,  $P<0.05$ ) and NO<sub>x</sub> ( $R=0.25$ ,  $P<0.05$ ) (Supplementary Fig. S1).

	Acute phase of MI	6-month follow-up	P value
Arginine, $\mu\text{M}$	61.5 (39.4, 80.4)	31.5 (23.7, 67.3)	0.002
Citrulline, $\mu\text{M}$	14.0 (7.1, 20.2)	8.3 (5.8, 25.5)	0.699
Ornithine, $\mu\text{M}$	69.3 (41.1, 101.9)	50.1 (31.0, 88.3)	0.424
Proline, $\mu\text{M}$	2.50 (1.75, 3.39)	2.73 (1.78, 3.82)	0.057
ADMA, $\mu\text{M}$	2.08 (1.34, 2.52)	1.22 (0.76, 2.41)	0.032
$\text{NO}_x$ , $\mu\text{M}$	8.23 (5.94, 10.95)	5.90 (3.82, 8.05)	<0.001
<b>Amino acid and <math>\text{NO}_x</math> indices</b>			
GABR	0.79 (0.51, 0.99)	0.62 (0.48, 0.84)	0.015
Ornithine/Arginine	1.10 (0.84, 1.65)	1.35 (0.98, 1.79)	0.110
Citrulline/Ornithine	0.19 (0.16, 0.25)	0.21 (0.15, 0.27)	0.858
Citrulline/Arginine	0.22 (0.17, 0.28)	0.25 (0.20, 0.33)	0.002
Arginine/ADMA	30.6 (25.7, 40.3)	30.6 (21.6, 37.6)	0.317
$\text{NO}_x$ /arginine	0.15 (0.09, 0.27)	0.15 (0.10, 0.24)	0.071
$\text{NO}_x$ /ADMA	4.27 (2.51, 8.19)	3.92 (2.31, 7.44)	0.020

**Table 3.** Arginine metabolites and their indices. Abbreviations: data are shown as median (interquartile range), ADMA: asymmetric dimethylarginine, GABR: global arginine bioavailability ratio, MI: myocardial infarction,  $\text{NO}_x$ : nitrite/nitrate.

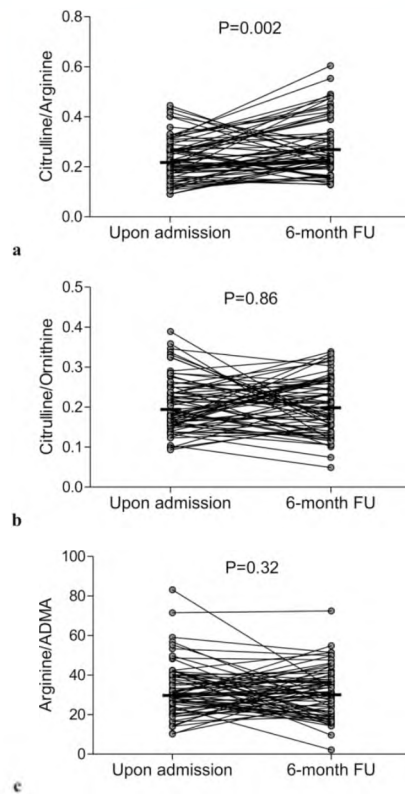
**Arginine metabolites versus CMR findings in acute phase of MI.** Arginine metabolites measured upon admission in the acute phase of MI were not associated with indexed LV volumes, LV mass or LV ejection fraction as determined with CMR 2–4 days following PCI except for arginine and LV end-systolic volume index (Table 4). However, there were significant correlations between arginine, citrulline, ornithine and ADMA versus AAR expressed as a ratio of LV and IS expressed as a ratio of LV (Table 4). The concentrations of arginine (62.8 [49.6–81.8] versus 29.1 [16.8–76.4]  $\mu\text{M}$ ,  $P=0.021$ ) and ADMA (2.11 [1.76–2.57] versus 0.74 [0.51–2.13]  $\mu\text{M}$ ,  $P=0.009$ ) were higher but  $\text{NO}_x$  (7.7 [5.7–9.6] versus 11.4 [8.4–13.4]  $\mu\text{M}$ ,  $P=0.003$ ) was lower in patients with MVO when compared to subjects without MVO (Fig. 2).

**$\text{NO}_x$  indices versus CMR findings in acute phase of MI.** The  $\text{NO}_x$ /arginine and  $\text{NO}_x$ /ADMA ratios were associated with the burden of ischemia, myocardial injury, and also LV volumes. The lower values of  $\text{NO}_x$ /arginine ratio, the bigger indices of AAR/LV and of IS/LV, and the higher indexed end-diastolic and end-systolic LV volumes (Supplementary Table S4). Patients with MVO had lower  $\text{NO}_x$ /arginine ratios when compared with subject without MVO (0.13 [0.08–0.22] versus 0.36 [0.11–0.61],  $P=0.022$ ) (Fig. 2). At baseline, also  $\text{NO}_x$ /ADMA ratio was inversely correlated with AAR/LV, IS/LV, LVEDVI and LVESVI (Supplementary Table S4). Patients with MVO had lower  $\text{NO}_x$ /ADMA ratio when compared with subject without MVO (3.91 [2.28–6.34] versus 12.90 [3.19–20.84],  $P=0.007$ ) (Fig. 2).

**Arginine metabolites versus CMR findings in chronic phase.** At 6-month follow-up, only proline was correlated with indexed LV volumes and LV mass. Simultaneously, higher values of citrulline/ornithine ratio were associated with smaller LV mass, lower indexed LV volumes, and better LVEF (Table 4).

**Long-term clinical outcomes.** All patients completed 1- and 5-year follow-up assessments (Supplementary Table S5). Within the first year, 1 patient died, recurrent MI occurred in 4 survivors, and 2 patients required hospitalization due to HF decompensation. After the first year, 4 additional patients died, a recurrent MI occurred in 6 patients, and 8 patients required hospitalization due to HF. There was no stroke in the studied group. Within 5 years following MI, death, recurrent MI, or HF requiring hospitalization were found in 20 (28.6%) patients. At 5 years, ischemic symptoms with CCS class  $\geq 2$  were present in 11 patients (20%) and dyspnea with NYHA class  $\geq 2$  was reported in 19 (34.5%) patients.

The median time elapsed since baseline blood sampling to UPLC-MS/MS measurements was similar in patients with versus without composite endpoint including death, recurrent MI or HF hospitalization (84 [79–88] versus 84 [80–87] months respectively,  $P=0.58$ ). There were no correlations between the storage time versus concentrations of arginine metabolites ( $r$  from  $-0.07$  to  $0.20$ ,  $P>0.05$  for all) and  $\text{NO}_x$  ( $r=0.22$ ,  $P=0.12$ ). There were no differences in concentrations of baseline arginine (57.5 [24.1–70.8] versus 63.7 [41.1–81.82],  $P=0.53$ ) between patients with or without composite endpoint. In turn, the follow-up arginine concentration reached the area under the ROC curve of 0.67 (95% confidence interval 0.54–0.81,  $P=0.025$ ) for prediction of death, recurrent MI or HF hospitalization with sensitivity of 66% and specificity of 65%. Its cut-off value of  $<29 \mu\text{M}$  was associated with lower event free survival ( $P=0.02$ ) (Fig. 3). By Cox regression, arginine concentration lower than  $29 \mu\text{M}$  when measured 6 months following MI adjusted to age, sex and IS was independently associated with more frequent composite endpoint including death, recurrent MI or HF hospitalization (Table 5).



**Figure 1.** The shifts of balance of arginine metabolites between acute phase of myocardial infarction and stable chronic conditions. Following ischemia (a) citrulline/arginine index decreased when compared with stable chronic conditions while (b) citrulline/ornithine and (c) arginine/ADMA indices maintained unchanged. Data are shown as absolute values, horizontal lines indicate medians. ADMA asymmetric dimethylarginine, FU follow-up.

## Discussion

The present study provides new findings. First, it enables indirect insight into the balance of arginine metabolites in patients with acute MI. Second, the association of arginine metabolites to myocardial I/R injury can strengthen prognostics to improve clinical outcomes.

We have found that plasma levels of ADMA and arginine are elevated following an ischemic phase of MI. Moreover, a higher arginine concentration has been noticed in patients with better developed collateral blood flow to the infarct territory, suggesting their wash out from necrotic myocardium through efficient collaterals. Simultaneously, in acute phase of MI the citrulline/arginine ratio was significantly decreased when compared with stable follow-up phase whereas ratios of citrulline/ornithine and arginine/ADMA maintained unchanged at both time points indirectly indicating that following ischemia conversion of elevated plasma arginine concentration is shifted from NOS towards arginase, despite the lack of enhanced suppressive potential of ADMA for NOS. In turn, the constant balance between metabolites of urea cycle suggested that its enzymes had the same effectiveness in both ischemic phase of MI and in stable chronic conditions, nevertheless it should be remembered that the amount of substrate for arginase was higher in acute condition.

Arginine metabolism in patients with myocardial I/R is insufficiently understood. Most human studies of arginine metabolism examine various pathologies based on indirect methods assessing the concentration of substrates and products involved in arginine-related pathways<sup>16–19,26,35</sup>. Based on the results of animal studies, it is commonly accepted that in cardiac tissue induction of expression and activation of arginase I is an early response to hypoxic stress<sup>36</sup>. At the same time, metabolic activity of NOS competing for the same substrate arginine is reduced or even blocked, because NO formation from arginine requires oxygen<sup>37</sup>. McQuillan et al. proved that during hypoxia expression of constitutive NOS was reduced by 40–60% in the endothelial cells for

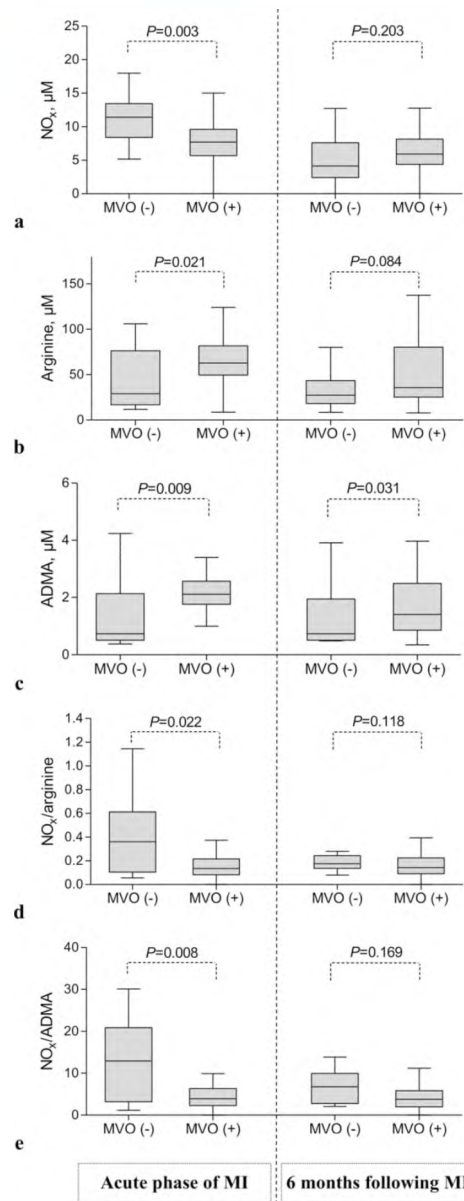
	Proline	Citrulline	ADMA	Ornithine	Arginine	NO <sub>x</sub>
<b>Upon admission during acute phase of myocardial infarction</b>						
Left ventricular end-diastolic volume index, ml/m <sup>2</sup>						
r	0.052	0.211	0.187	0.171	0.171	-0.161
P	0.672	0.080	0.122	0.157	0.158	0.184
Left ventricular end-systolic volume index, ml/m <sup>2</sup>						
r	-0.011	0.192	0.167	0.146	0.238	-0.040
P	0.931	0.112	0.168	0.229	0.047	0.746
Left ventricular mass index, g/m <sup>2</sup>						
r	0.090	0.081	0.160	0.089	0.165	-0.101
P	0.459	0.505	0.186	0.465	0.172	0.406
Left ventricular ejection fraction, %						
r	0.075	-0.095	-0.082	-0.054	-0.234	-0.113
P	0.536	0.436	0.498	0.657	0.052	0.351
Area at risk/left ventricular mass						
r	<b>0.253</b>	<b>0.371</b>	<b>0.342</b>	<b>0.359</b>	<b>0.337</b>	-0.025
P	<b>0.035</b>	<b>0.002</b>	<b>0.004</b>	<b>0.002</b>	<b>0.004</b>	0.836
Infarct size/left ventricular mass						
r	0.141	<b>0.254</b>	<b>0.327</b>	<b>0.268</b>	<b>0.365</b>	-0.079
P	0.244	<b>0.034</b>	<b>0.006</b>	<b>0.025</b>	<b>0.002</b>	0.518
Microvascular obstruction/infarct size						
r	-0.008	0.091	0.110	0.072	0.186	-0.049
P	0.948	0.452	0.363	0.555	0.123	0.685
<b>6 month follow-up</b>						
Left ventricular end-diastolic volume index, ml/m <sup>2</sup>						
r	<b>0.242</b>	-0.084	-0.050	0.072	-0.004	-0.005
P	<b>0.045</b>	0.494	0.685	0.557	0.973	0.970
Left ventricular end-systolic volume index, ml/m <sup>2</sup>						
r	<b>0.239</b>	-0.099	-0.036	0.070	0.013	0.008
P	<b>0.047</b>	0.419	0.770	0.564	0.916	0.951
Left ventricular mass index, g/m <sup>2</sup>						
r	0.252	-0.068	-0.025	0.114	-0.029	0.093
P	0.036	0.581	0.839	0.351	0.811	0.448
Left ventricular ejection fraction, %						
r	-0.139	0.134	0.026	-0.051	-0.014	0.021
P	0.256	0.272	0.834	0.678	0.912	0.865
Infarct size/left ventricular mass						
r	0.163	0.208	0.236	0.212	0.231	0.233
P	0.180	0.086	0.051	0.080	0.060	0.055

**Table 4.** Arginine metabolites versus cardiac magnetic resonance imaging findings. ADMA asymmetric dimethylarginine, NO<sub>x</sub> nitrite/nitrate, arginine metabolites were expressed in μM, r correlation coefficient.

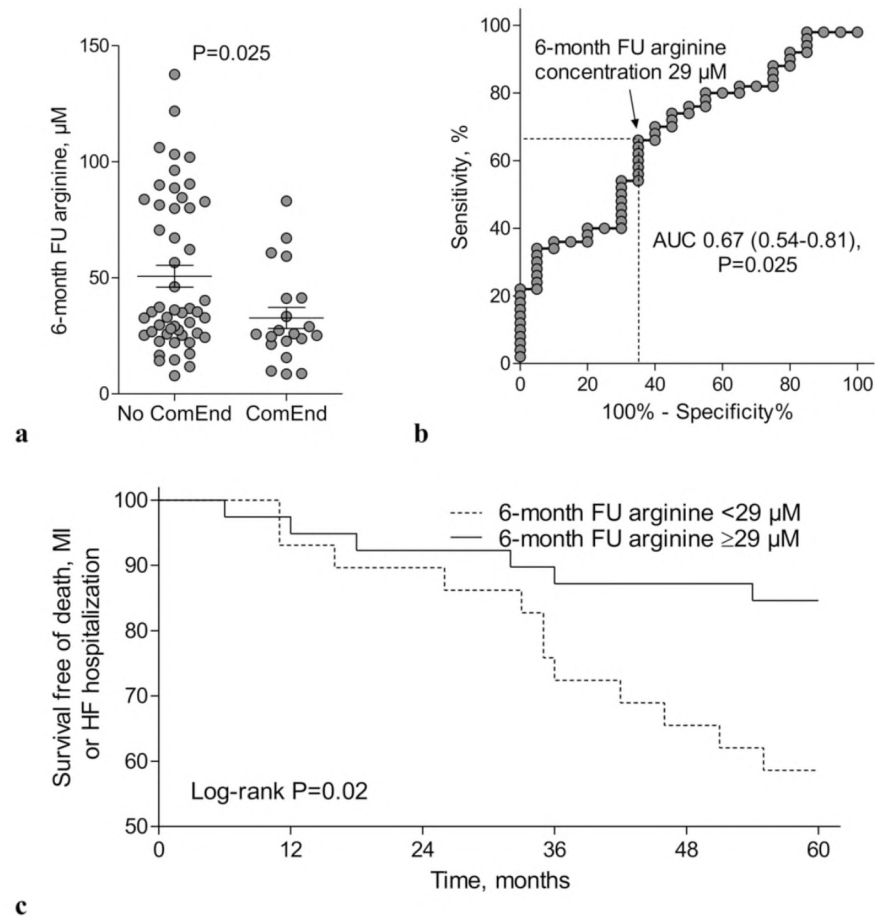
at least 48 h<sup>38</sup>. The question whether this metabolic shift from NOS towards arginase is beneficial for the survival of ischemic tissues remains a matter of debate. One hypothesis maintains that under the condition of inactive NOS, the reduction of arginine pool by activated arginase may protect cells<sup>36</sup>. The observed shift during acute phase of MI was accompanied by unchanged suppressive potential of ADMA. ADMA however, was identified in several studies as a prognostic marker for cardiovascular risk<sup>39</sup> including MI patients<sup>40</sup>.

In this study we have shown for the first time that in patients with acute MI, plasma concentration of arginine and its metabolites ornithine, citrulline and ADMA when measured upon admission, were associated with the severity of all morphological features of I/R injury of the left ventricle including AAR, IS and the presence of MVO. Experimental studies indicate that a non-selective NOS inhibitor L-NAME administered 10 min before reperfusion did not reduce no-reflow phenomenon and infarct size<sup>41</sup> while ischemic preconditioning attenuated both of them via endothelial NOS activation<sup>42</sup>. Recently Fernandez-Jiménez et al.<sup>43</sup> have shown temporal dynamics and extent of edema, IS, MVO and intramyocardial hemorrhage during myocardial I/R. Edema formation had a bimodal temporal distribution and was ameliorated only with cardioprotective interventions. In turn, the area of intramyocardial hemorrhage and MVO varied according to the time of ischemia, CMR timing and cardioprotective strategy. In this context, beyond infarct size reduction also the attenuation of coronary microvascular injury seems to be of particular importance<sup>44-46</sup>. On the other hand, our results indicate that under





**Figure 2.** Arginine, ADMA,  $\text{NO}_x$  and their indices in relation to microvascular obstruction. In acute phase of MI, in patients with MVO plasma level of (a)  $\text{NO}_x$  was lower but (b) arginine and (c) ADMA concentrations were higher than in patients without MVO. (d) In patients with MVO,  $\text{NO}_x/\text{arginine}$  and (e)  $\text{NO}_x/\text{ADMA}$  ratios were lower than in subjects without MVO. Apart from ADMA there were no differences between patients with and without MVO at stable chronic phase. Abbreviations: Box plot shows median and interquartile range (IQR, Q3 to Q1). Q1 and Q3 are the first and third quartiles. Whiskers are drawn at minimum and maximum. MVO: microvascular obstruction present (+) or absent (-), ADMA: asymmetric dimethylarginine,  $\text{NO}_x$ : nitrite/nitrate, MI: myocardial infarction. MVO was determined with an in-house-developed, vendor-independent, cardiac-dedicated software (CardioViewer, baseline version, Catholic University Leuven, Leuven, Belgium)<sup>34</sup>.



**Figure 3.** Prognostic value of arginine or  $\text{NO}_x$  concentration. (a) The 6-month concentration of arginine was lower in patients with composite endpoint including death, recurrent MI or HF hospitalization during 5-year follow-up. (b) At 6-month follow-up arginine concentration reached the area under the ROC curve of 0.67 ( $P=0.025$ ) for prediction of death, recurrent MI or HF hospitalization with sensitivity of 66% and specificity of 65% and (c) its cut-off value of  $<29 \mu\text{M}$  was associated with lower event free survival. *ComEnd* composite endpoint, *HF* heart failure, *MI* myocardial infarction,  $\text{NO}_x$  nitrite/nitrate, *FU* follow-up, *AUC* area under the receiver operating characteristic curve.

	Univariable model			Multivariable model		
	<i>P</i> value	HR	95% CI for HR	<i>P</i> value	HR	95% CI for HR
Age, per 1 year	0.864	1.01	0.97–1.06	0.986	1.00	0.96–1.05
Female gender, yes versus no	0.303	2.17	0.50–9.42	0.386	1.94	0.43–8.71
Infarct size/left ventricular mass, per 0.01	0.550	0.39	0.02–8.56	0.711	0.51	0.02–17.30
Arginine level $<29 \mu\text{M}$ at 6-month follow-up, yes versus no	0.027	3.02	1.13–8.06	0.047	2.76	1.01–7.57

**Table 5.** The independent predictors of death, recurrent myocardial infarction or hospitalization due to heart failure decompensation. *CI* confidence interval, *HR* hazard ratio,  $\text{NO}_x$  nitrite/nitrate.

stable conditions higher proline levels were associated with larger LV volumes and mass. Moreover, the lower the ratio of citrulline/ornithine suggesting metabolic shift from NOS towards arginase, the larger LV volumes and mass. Experimental studies revealed that activation of arginase-dependent polyamine metabolism associated with proline synthesis has a pro-hypertrophic significance<sup>17</sup>.

We found also that the total amount of NO<sub>x</sub> in stable chronic phase, but not in acute phase of MI, was correlated with plasma concentration of arginine, citrulline and ornithine. Undoubtedly, in acute phase of MI, activation of inducible NOS and the fact that patients were non-fasting could affect NO<sub>x</sub> plasma level. The concentrations of ADMA and L-arginine as measured by HPLC both in MI patients as well as in healthy volunteers were comparable with our results<sup>18,49</sup> but NO<sub>x</sub> levels in healthy volunteers determined with a Griess method were higher than ours<sup>49</sup>. Keeping in mind all the limitations associated with non-fasting measurements of plasma NO<sub>x</sub> level during acute phase of MI, in this study the new ratios of NO<sub>x</sub>/arginine and NO<sub>x</sub>/ADMA were analyzed. These indices were inversely correlated with both morphological features of I/R injury including territory of ischemia, myocardial necrosis and area of damaged microvasculature as well as with LV end-systolic and end-diastolic volumes. Nevertheless, our preliminary data regarding ratios of NO<sub>x</sub>/arginine and NO<sub>x</sub>/ADMA need to be interpreted with caution, require further validation and their biological relevance remains unknown, the more that NO<sub>x</sub> cannot be used as a marker of NO production<sup>5,27</sup>.

Can interventions interfering arginine metabolism reduce I/R injury and/or improve MI outcomes? Theoretically, therapies that lead to NO increase may potentially show benefit in cardiovascular disorders, as its decreased concentration plays a key role in multiple dysfunctions. The shifted balance of arginine metabolites from arginase towards NOS found in our study indicates that treatment with arginase inhibitors administered in acute phase of MI may be effective. Jung et al. demonstrated that systemic arginase inhibition reduced IS in rats by 50% in a mechanism dependent on NOS activity and NO bioavailability<sup>51</sup>. Also, local intracoronary arginase inhibitor infusion started 5 min before reperfusion in a pig model of MI reduced IS by 50%<sup>50</sup>. In turn, an intravenous co-administration of L-arginine and tetrahydrobiopterin 5 min before reperfusion reduced IS and this effect was mediated by NOS-dependent pathways resulting in diminished superoxide generation<sup>51</sup>. Although, several specific inhibitors of arginase are available, their systemic mechanism of action is a major limitation of such therapy in humans<sup>1</sup>. Our findings also suggest that in the acute phase of MI, when arginine plasma concentration is high, its supplementation may not bring expected benefit. In contrast, in stable conditions following MI, higher arginine concentrations were associated with better long-term outcomes. Thus, arginine supplementation at that moment might be beneficial. However, available data from VINTAGE MI clinical trial has demonstrated increased mortality associated with arginine supplementation after MI<sup>52</sup>.

Our study has several limitations. First, the analyzed group is relatively small, however sample size was appropriately calculated whereas arginine metabolites and myocardial injury were meticulously measured using the recommended methods. Second, arginine metabolites were not measured in acute phase following reperfusion. Third, non-fasting blood samples in acute phase of MI have been taken, therefore we cannot exclude alternative sources of NO<sub>x</sub> associated with diet. However, before follow-up blood sampling dietary intake was controlled for nitrate/nitrite. Nevertheless, both acute and chronic measurements of NO<sub>x</sub> could be confounded by liver metabolism, formation by gastric bacteria, nitrate renal clearance, or contamination<sup>5,27</sup>. Fourth, as the red blood cells are involved in metabolism of arginine and were not examined in this study, the analysis of blood plasma represents only a part of the L-arginine-NO metabolism in the whole blood<sup>6,7</sup>. Another limitation of this study is lack of age matched control group, however all patients were examined twice in acute and chronic phase. Finally, the study population is homogenous in terms of race and ethnicity, thus the data may not be reflective of other more heterogeneous populations.

In conclusion, our findings provide arguments that during acute ischemia in patients with STEMI, conversion of elevated plasma arginine concentration released from damaged cardiac myocytes is shifted from NOS towards arginase, despite the lack of enhanced suppressive potential of asymmetric dimethylarginine for NOS. Measured upon admission, arginine metabolites reflected myocardial and microvascular I/R injury. Simultaneously, decreased arginine concentrations during stable chronic phase were associated with worse long-term clinical outcomes. These findings of potentially clinical relevance may be useful in the development of cardioprotective therapy based on the arginine metabolism in STEMI patients.

Received: 27 October 2020; Accepted: 17 December 2020

Published online: 08 January 2021

## References

- Morris, S. M. Jr. Arginine metabolism revisited. *J. Nutr.* **146**, 2579S–2586S (2016).
- Caldwell, R. W., Rodriguez, P. C., Toque, H. A., Narayanan, S. P. & Caldwell, R. B. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease. *Physiol. Rev.* **98**, 641–665 (2018).
- Popolo, A., Adesso, S., Pinto, A., Autore, G. & Marzocco, S. L-Arginine and its metabolites in kidney and cardiovascular disease. *Amin. Acids* **46**, 2271–2286 (2014).
- Förstermann, U. & Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* **33**, 829–837 (2012).
- DeMartino, A. W., Kim-Shapiro, D. B., Patel, R. P. & Gladwin, M. T. Nitrite and nitrate chemical biology and signalling. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 228–245 (2019).
- Kleinbongard, P. et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* **107**, 2943–2951 (2006).
- Cortese-Krott, M. M. et al. Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease. *Blood* **120**, 4229–4237 (2012).
- Wood, K. C. et al. Circulating blood endothelial nitric oxide synthase contributes to the regulation of systemic blood pressure and nitrite homeostasis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 1861–1871 (2013).

9. Jensen, M., Müller, C., Choe, C. U., Schwedhelm, E. & Zeller, T. Analysis of L-arginine:glycine amidinotransferase-, creatine- and homoarginine-dependent gene regulation in the murine heart. *Sci. Rep.* **10**, 4821 (2020).
10. Reffelmann, T. & Kloner, R. A. Microvascular reperfusion injury: rapid expansion of anatomic no reflow during reperfusion in the rabbit. *Am. J. Physiol.* **283**, H1099–H1107 (2002).
11. Kloner, R. A. *et al.* Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? *Circulation* **62**, 945–952 (1980).
12. Fishbein, M. C. *et al.* The relationship of vascular injury and myocardial hemorrhage to necrosis after reperfusion. *Circulation* **62**, 1274–1279 (1980).
13. Mallat, R. K., John, C. M., Kendrick, D. J. & Braun, A. P. The vascular endothelium: a regulator of arterial tone and interface for the immune system. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **54**, 458–470 (2017).
14. Su, Y. & Block, E. R. Acute hypoxia increases intracellular L-arginine content in cultured porcine pulmonary artery endothelial cells. *J. Cell Physiol.* **167**, 349–353 (1996).
15. Zharikov, S. I., Herrera, H. & Block, E. R. Role of membrane potential in hypoxic inhibition of L-arginine uptake by lung endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **272**, L78–L84 (1997).
16. Tang, W. H. W., Wang, Z., Cho, L., Brennan, D. M. & Hazen, S. L. Diminished global arginine bioavailability and increased arginine catabolism as metabolic profile of increased cardiovascular risk. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 2061–2067 (2009).
17. Sourij, H. *et al.* Arginine bioavailability ratios are associated with cardiovascular mortality in patients referred to coronary angiography. *Atherosclerosis* **218**, 220–225 (2011).
18. Wang, Z., Tang, W. H. W., Cho, L., Brennan, D. M. & Hazen, S. L. Targeted metabolomic evaluation of arginine methylation and cardiovascular risks: potential mechanisms beyond nitric oxide synthase inhibition. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1383–1391 (2009).
19. Nicholls, S. J. *et al.* Metabolic profiling of arginine and nitric oxide pathways predicts hemodynamic abnormalities and mortality in patients with cardiogenic shock after acute myocardial infarction. *Circulation* **116**, 2315–2324 (2007).
20. Zhou, Z. *et al.* Erythrocytes from patients with type 2 diabetes induce endothelial dysfunction via arginase 1. *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 769–780 (2018).
21. Jung, C., Gonon, A. T., Sjöquist, P. O., Lundberg, J. O. & Pernow, J. Arginase inhibition mediates cardioprotection during ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **85**, 147–154 (2010).
22. Bode-Böger, S. M., Scalerà, F. & Ignarro, L. J. The L-arginine paradox: importance of the L-arginine/asymmetric dimethylarginine ratio. *Pharmacol. Ther.* **114**, 295–306 (2007).
23. Seljeflot, I., Nilsson, B. B., Westheim, A. S., Bratseth, V. & Arnesen, H. The L-arginine-asymmetric dimethylarginine ratio is strongly related to the severity of chronic heart failure: no effects of exercise training. *J. Card. Fail.* **17**, 135–142 (2011).
24. Lüneburg, N. *et al.* Reference intervals for plasma L-arginine and the L-arginine:asymmetric dimethylarginine ratio in the Framingham Offspring Cohort. *J. Nutr.* **141**, 2186–2190 (2011).
25. Notsu, Y., Yano, S., Shibata, H., Nagai, A. & Nabika, T. Plasma arginine/ADMA ratio as a sensitive risk marker for atherosclerosis: Shimane CoHRE study. *Atherosclerosis* **239**, 61–66 (2015).
26. Yu, E. *et al.* Plasma arginine/asymmetric dimethylarginine ratio and incidence of cardiovascular events: a case-cohort study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **102**, 1879–1888 (2017).
27. Kim-Shapiro, D. B. & Gladwin, M. T. Pitfalls in measuring NO bioavailability using NOx. *Nitric Oxide* **44**, 1–2 (2015).
28. Lauer, T. *et al.* Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12814–12819 (2001).
29. Alp, N. J. & Channon, K. M. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydropterin in vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 413–420 (2004).
30. Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A. & Dalle-Donne, I. Nitrate and nitrite measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. *Methods Enzymol.* **440**, 361–380 (2008).
31. The TIMI Study Group. The thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) trial. *N. Eng. J. Med.* **312**, 932–936 (1993).
32. Zalewski, J. *et al.* Detection of microvascular injury by evaluating epicardial blood flow in early reperfusion following primary angioplasty. *Int. J. Cardiol.* **96**, 389–396 (2004).
33. Zalewski, J. *et al.* Cyclosporine A reduces microvascular obstruction and preserves left ventricular function deterioration following myocardial ischemia and reperfusion. *Basic Res. Cardiol.* **110**, 18 (2015).
34. Symons, R. *et al.* Long-Term incremental prognostic value of cardiovascular magnetic resonance after ST-Segment elevation myocardial infarction: a study of the collaborative registry on CMR in STEMI. *JACC Cardiovasc. Imaging* **11**, 813–825 (2018).
35. Schwemer, T. F. *et al.* Effect of ranolazine on plasma arginine derivatives and urinary isoprostanol 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in patients with myocardial infarction in the randomized RIMINI-Trial. *Sci. Rep.* **9**, 5708 (2019).
36. Schlüter, K. D., Schulz, R. & Schreckenberger, R. Arginase induction and activation during ischemia and reperfusion and functional consequences for the heart. *Front. Physiol.* **6**, 65 (2015).
37. Ho, J. J., Man, H. S. & Marsden, P. A. Nitric oxide signaling in hypoxia. *J. Mol. Med. (Berl)* **90**, 217–231 (2012).
38. McQuillan, L. P. *et al.* Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am. J. Physiol.* **267**, H1921–H1927 (1994).
39. Boger, R. H. *et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* **98**, 1842–1847 (1998).
40. Sen, N. *et al.* Elevated plasma asymmetric dimethylarginine level in acute myocardial infarction patients as a predictor of poor prognosis and angiographic impaired reperfusion. *Atherosclerosis* **219**, 304–310 (2011).
41. Piarrakos, C. N. *et al.* Effects of L-NAME on coronary blood flow, infarct size and the extent of the no-reflow phenomenon. *Int. J. Cardiol.* **167**, 3000–3005 (2013).
42. Li, X. D. *et al.* PKA-mediated eNOS phosphorylation in the protection of ischemic preconditioning against no-reflow. *Microvasc. Res.* **84**, 44–54 (2012).
43. Fernandez-Jiménez, R. *et al.* Effect of ischemia duration and protective interventions on the temporal dynamics of tissue composition after myocardial infarction. *Circ. Res.* **121**, 439–450 (2017).
44. Heusch, G. Coronary microvascular obstruction: the new frontier in cardioprotection. *Basic Res. Cardiol.* **114**, 45 (2019).
45. Hausenloy, D. J. *et al.* The coronary circulation in acute myocardial ischaemia/reperfusion injury: a target for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* **115**, 1143–1155 (2019).
46. Heusch, G., Kleinbongard, P. & Rassaf, T. Cardioprotection beyond infarct size reduction. *Circ. Res.* **124**, 679–680 (2019).
47. Schlüter, K. D. *et al.* Central role for ornithine decarboxylase in β-adrenoceptor mediated hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **45**, 410–417 (2000).
48. Romitelli, F. *et al.* Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **851**, 257–267 (2007).
49. Yada, T. *et al.* Changes of asymmetric dimethylarginine, nitric oxide, tetrahydropterin, and oxidative stress in patients with acute myocardial infarction by medical treatments. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **37**, 269–276 (2007).
50. Gonon, A. T. *et al.* Local arginase inhibition during early reperfusion mediates cardioprotection via increased nitric oxide production. *PLoS One.* **7**, e42038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042038> (2012).

51. Tratsiakovich, Y. *et al.* Myocardial protection by co-administration of L-arginine and tetrahydrobiopterin during ischemia and reperfusion. *Int. J. Cardiol.* **169**, 83–88 (2013).
52. Schulman, S. P. *et al.* L-Arginine therapy in acute myocardial infarction: the vascular interaction with age in myocardial infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *JAMA* **295**, 58–64 (2006).

#### Author contributions

Conception: P. M., J. Z., data collection and analysis: P. M., P. Z., A. W., J. N., J. Z., data interpretation: P. M., J. Z., manuscript drafting and revision: P. M., P. Z., A. W., J. N., J. Z.

#### Funding

This work was supported by the grant of National Science Center of Poland (2016/21/B/NZ5/01378 to J.Z.).

#### Competing interests

The authors declare no competing interests.

#### Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80230-3>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to J.Z.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

5.2. Publikacja 2: *„Thin-cup fibroatheroma and increased thickness of coronary intima-media complex in the infarct-related artery are associated with altered balance of plasma arginine metabolites”*

This is a provisional PDF only. Copyedited and fully formatted version will be made available soon.

**Thin-cap fibroatheroma and increased coronary intima-media thickness  
are associated with an altered arginine metabolites balance**

**Authors:** Patrycja Mołek, Paweł Żmudzki, Andrzej Machnik, Grażyna Nowak, Konrad Stępień, Mateusz Wnuk, Aleksandra Włodarczyk, Karol Nowak, Radosław Rychlak, Jadwiga Nessler, Jarosław Zalewski

**Article type:** Original article

**Received:** September 13, 2022.

**Revision accepted:** October 6, 2022.

**Published online:** October 13, 2022.

**ISSN:** 1897-9483

Pol Arch Intern Med.

doi:10.20452/pamw.16356

Copyright by the Author(s), 2023

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License ([CC BY-NC-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)), allowing third parties to copy and redistribute the material in any medium or format and to remix, transform, and build upon the material, provided the original work is properly cited, distributed under the same license, and used for noncommercial purposes only. For commercial use, please contact the journal office at [pamw@mp.pl](mailto:pamw@mp.pl).

**Thin-cap fibroatheroma and increased coronary intima-media thickness are associated with an altered arginine metabolites balance**

Patrycja Mołek<sup>1,2</sup>, Paweł Żmudzki<sup>3</sup>, Andrzej Machnik<sup>4</sup>, Grażyna Nowak<sup>4</sup>, Konrad Stępień<sup>1,2</sup>, Mateusz Wnuk<sup>2</sup>, Aleksandra Włodarczyk<sup>1</sup>, Karol Nowak<sup>1</sup>, Radosław Rychlak<sup>2</sup>, Jadwiga Nessler<sup>1,2</sup>, Jarosław Zalewski<sup>1,2</sup>

1 Department of Coronary Disease and Heart Failure, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

2 Clinical Department of Coronary Disease and Heart Failure, John Paul II, Hospital, Kraków, Poland

3 Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

4 Clinical Department of Interventional Cardiology, John Paul II Hospital, Kraków, Poland

**Correspondence to:** Jarosław Zalewski, MD, PhD, ul. Pradnicka 80, 31-202 Kraków, Poland, phone: +48 12 614 22 18, email: jzalewski@szpitaljp2.krakow.pl, ORCID: 0000-0002-4374-3694

**What's new?**

Nitric oxide synthase (NOS) produces a potent signaling molecule nitric oxide but arginase competes with NOS for the same substrate arginine reducing nitric oxide production. This study demonstrates that during the acute phase of myocardial infarction arginine metabolism is shifted towards arginase over NOS. An enhanced arginase activity in the acute setting is associated with the presence of the features of unstable coronary plaque responsible for acute



coronary syndromes expressed as thin-cap fibroatheroma. In turn, a similar residual metabolic shift towards arginase in the chronic phase is correlated with a higher thickness of intima-media in the stable segments of infarct-related artery. The current study provides arguments that arginine metabolites and their derivatives might be considered as the new, non-invasive indicators useful for identification of patients who are more likely to have vulnerable plaque as well as for monitoring of the extent of chronic atherosclerotic lesions.

### **Abstract**

**Introduction:** Arginase inhibition increases plasma citrulline, citrulline / ornithine ratio (C / O), and reduces plasma ornithine, ornithine / arginine ratio (O / A) in animal model of myocardial infarction (MI).

**Objectives:** We hypothesize that the presence of thin-cap fibroatheroma (TCFA) in the culprit lesion and increased non-culprit intima-media thickness of an infarct-related artery (IRA) are associated with an altered balance of arginine metabolites.

**Patients and methods:** Arginine and its metabolites were measured using liquid chromatography and tandem mass spectrometry in 100 consecutive MI patients upon admission and at 6-month follow-up. TCFA and adjacent to culprit proximal and distal 10-mm segments were assessed with optical coherence tomography in acute phase. As controls served 25 patients without coronary lesions in angiography.

**Results:** The C / O increased 5.33 times ( $P < 0.001$ ), while the O / A decreased 2.53 times ( $P < 0.001$ ) at 6-month follow-up compared with acute MI phase. Patients with ( $n = 75$ ) versus without ( $n = 25$ ) TCFA had lower C / O by 29% ( $P = 0.003$ ) while the mean intima-media diameter of adjacent non-culprit region correlated with follow-up O / A ( $R = 0.337$ ,  $P = 0.003$ ). By multivariable analysis, a higher acute phase C / O was associated with a lower risk of TCFA presence (odds ratio 0.978, 95% confidence interval 0.962–0.994,  $P = 0.006$ )

whereas higher follow-up O / A correlated with larger intima-media diameter of adjacent segments (beta-coefficient 0.227, 95% confidence interval for beta-coefficient 0.045–0.409,  $P = 0.018$ ).

**Conclusions:** The enhanced arginase activity over nitric oxide synthase following ischemia was associated with the presence of TCFA in the culprit lesion, while similar metabolic shift in chronic phase correlated with a higher thickness of intima-media in the adjacent non-culprit IRA segments.

**Key words**

arginine, atherosclerosis, metabolism, myocardial infarction, optical coherence tomography

**Introduction**

Endothelial dysfunction is identified by an impaired endogenous vasorelaxant ability associated mainly with uncoupling of endothelial nitric oxide synthase (NOS) [1, 2]. At every stage of atherosclerotic plaque remodeling, formation of a fibrous cap overlying a lipid necrotic core that is prone to rupture and to trigger thrombus generation may occur. In an intact endothelial lining NOS metabolizes L-arginine to L-citrulline and nitric oxide (NO). On the other hand, L-arginine can be competitively catalyzed to L-ornithine by arginase, an enzyme participating in the final step of the urea cycle [3-5]. Thus, the metabolic competition of both enzymes for L-arginine may potentially contribute to the thin-cap fibroatheroma (TCFA) formation or coronary plaque remodeling.

Several lines of evidence indicate that different biomarkers or ratios might be useful in cardiovascular prognosis after myocardial infarction (MI) [6-8]. Atherogenic lipoproteins, mainly low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, initiate atherosclerosis by depositing in the arterial intima [9] and promote arterial wall inflammation [10]. This systemic inflammatory

response can be measured by high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), which is strongly associated with cardiovascular risk [11, 12]. Other biomarkers including acid-base balance parameters [13], apolipoprotein-associated phospholipase A2 [14], matrix metalloproteinases 2 and 9 [15], myeloperoxidase [16], and oxidized LDL [10] were found to be associated with plaque instability in acute coronary syndromes. Nevertheless, none of those mediators or biomarkers is clinically effective to trace the process of endothelial dysfunction followed by asymptomatic atherosclerosis as well as to predict plaque vulnerability associated with acute adverse cardiovascular events.

TCFA with a lipid necrotic core covered by thin (<65  $\mu\text{m}$ ) fibrous intima layer is identified in 50–75% of MI patients [17-19]. In vivo performed serial intravascular imaging studies indicate that LDL cholesterol lowering therapy with statins [20,21] or proprotein convertase subtilisin kexin type 9 inhibitor [22,23] within 6 to 12 months dynamically increases a minimum fibrous cap thickness by 25–300%, reduces lipid content by 18–21% and macrophage infiltration by 15–32%, stabilizing a culprit lesion. In contrast, the same drugs reduce volume of stable coronary plaque at most by 0.9–2.2% within 9–12 months [23-25]. On the other hand, the experimental studies provide evidence that systemic arginase inhibition during myocardial ischemia and reperfusion is associated with changes in the balance of arginine metabolites [26] but their relationships with morphology of an infarct-related artery (IRA) remain poorly understood.

Thus, we sought to investigate whereas the presence of TCFA in the culprit vulnerable lesion and increased intima-media thickness in the adjacent to culprit segments with stable lesions are associated with an altered balance of arginine metabolites following myocardial infarction.

## **Patients and methods**

### **Patients**

Between January 2018 and June 2021, 100 Caucasian patients  $\geq 18$  years of age with an ST-segment elevation myocardial infarction who underwent primary percutaneous coronary intervention (PCI) were enrolled. The inclusion criteria were chest pain lasting no more than 12 hours at rest with an accompanying ST-segment elevation  $>1$  mm in 2 or more limb leads, or  $>2$  mm in 2 or more precordial leads, or a new left bundle branch block. The exclusion criteria were a lack of informed consent, cardiogenic shock or pulmonary edema, history of MI or PCI at the same location or coronary artery bypass surgery, history of cancer, venous thromboembolism, renal failure with glomerular filtration rate of  $<30$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, liver failure with increased bilirubin level of  $>2$  mg/dL and / or spontaneous INR of  $>2$  or contraindications to optical coherence tomography (OCT) imaging. As controls served group of 25 patients with chronic coronary syndrome similar to the MI group in terms of demographics, cardiovascular risk factors and comorbidities. Controls had no coronary lesions in angiography despite positive stress tests for ischemia. The demographic characteristics, cardiovascular risk factors, history of cardiovascular diseases and comorbidities were collected for all patients. Upon admission, hemoglobin, hematocrit, red and white blood cell count, platelet count (reference range [RR]  $140\text{--}440 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), lipid profile, glucose, creatinine (RR  $62\text{--}106 \mu\text{mol/L}$ ), high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP, RR  $<3.0$  mg/L) and fibrinogen (RR  $2.1\text{--}4.0$  g/L) were determined using standard laboratory techniques. Serum activity of isoenzyme MB of creatine kinase (CK-MB, RR  $0\text{--}24$  IU/L) as well as concentration of cardiac high-sensitivity troponin T (RR  $<0.014$  ng/mL) were measured upon admission, and then subsequently every 12 hours over the first 48 hours. Diabetes mellitus (DM) was established based on either a fasting glycemc level  $\geq 7$  mmol/L on 2 separate occasions or the use of hypoglycemic drugs. Diagnosis of a prior ischemic

stroke was based on a clinical presentation and positive computed tomography or magnetic resonance imaging findings. Dyslipidemia was based on either the usage of lipid-lowering therapy or when lipid levels were elevated above 5.0 mmol/L for total cholesterol or 2.6 mmol/L for low-density lipoprotein (LDL) cholesterol.

The study was approved by the Ethics Committee of Jagiellonian University (approval number 122.6120.61.2016), and all procedures were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. All study participants provided written informed consent prior to their inclusion to the study.

#### **Quantification of arginine metabolites**

The quantification of arginine metabolites was performed as previously described [27]. Briefly, blood samples were drawn into citrate tubes upon admission in the acute phase of an MI and again, 6 months later. The samples were centrifuged at 2500 g at 18 °C to 22 °C for 20 min and processed immediately or stored in aliquots at -80 °C until analysis. Plasma proteins for amino acid analysis were precipitated before measurement with 80% methanol. The concentrations of arginine, ornithine, citrulline, proline, spermidine, agmatine, asymmetric dimethylarginine (ADMA) and monomethyl arginine (MMA) were measured in duplicate by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) using a Waters ACQUITY UPLC (Waters Corporation, Milford, MA, USA) coupled to a Waters TQD mass spectrometer (electrospray ionization mode ESI-tandem quadrupole).

Chromatographic separations of amino acids were carried out using the Acquity UPLC BEH Amide column, 2.1×100 mm, and the 1.7 µm particle size equipped with a VanGuard Acquity UPLC BEH Amide pre-column. The column was maintained at 40°C and eluted under linear gradient elution from 20% to 35% of eluent A over 4 minutes followed by linear

gradient elution from 35% to 40% of eluent A over 6 minutes, with a flow rate of 0.3 mL/min. (Eluent A: water / formic acid (0.1%, v/v); eluent B: acetonitrile / formic acid (0.1%, v/v)).

The Waters TQD mass spectrometer parameters were optimized for quantitative analysis using the solutions of L-arginine, N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimethylarginine, L-citrulline, L-ornithine, L-proline, 4-((4-((2-aminoethyl)amino)naphthalen-1-yl)diazanyl)benzenesulfonamide, and chloramphenicol, concentration 10 µg/mL at a flow rate of 20 µL/min, and a mixture of eluents A and B 1:1 (v/v) at a flow rate of 0.28 mL/min.

Global arginine bioavailability ratio (GABR) was calculated as arginine level divided by the sum of concentrations of ornithine and citrulline.

### **Coronary angiography**

Coronary angiograms were acquired with Axiom Artis dFC (Siemens, Erlangen, Germany) and were analyzed offline using two contralateral projections for each artery before and after angioplasty if applicable. All coronary segments were evaluated for the presence of visible myocardial bridge, epicardial slow-flow, thrombus in the epicardial artery, distal embolization during and after primary PCI, as well as degree of stenosis based on visual inspection. In MI patients epicardial blood flow in the IRA was evaluated using the Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) scale [28].

### **Coronary artery wall pathology in optical coherence tomography**

**Image acquisition** All images were acquired with a commercially available system for OCT (Terumo, Tokyo, Japan). The OCT catheter was first advanced to the distal end of the IRA after aspiration thrombectomy followed by direct intracoronary injection of nitrates. The 80-mm length of IRA, including both the culprit lesion and adjacent to the culprit 10-mm

proximal and distal segments, was then scanned using the integrated automated pullback device with a resolution of image acquisition of 158 frames/mm. During image acquisition, coronary blood flow was replaced by continuous flushing of contrast media directly from the guiding catheter at a rate of 4 mL/second with a power injector to create a virtually blood-free environment. Pullback was repeated after completing the PCI procedure with stent implantation. All images were recorded digitally, stored, and each frame was analyzed by an independent investigator blinded to the laboratory tests.

**Image analysis** Offline systematic analysis was performed using proprietary software after confirming calibration settings in frame-by-frame intervals separately for culprit and adjacent non-culprit regions. The longitudinal view was used to identify the culprit lesion, and the adjacent to the culprit 10-mm proximal and 10-mm distal segment (Supplementary material, *Figure S1*).

Within the culprit lesion, its length, thrombus length, and the outlines of a lumen, vessel, and thrombus were contoured on each frame by multiple points trace function. Based on this contouring the lumen area, vessel area, thrombus area and lesion area, were calculated for each frame within the culprit lesion. The lesion volume was calculated as a mean difference between vessel area and lumen area multiplied by lesion length, whereas the thrombus volume was calculated as a mean thrombus area multiplied by thrombus length [29, 30]. In each case within the culprit lesion the presence of TCFA including its rupture, necrotic core, macrophages infiltration, vasa vasorum, or intramural hematoma were assessed. The amount of lipid was expressed as a length of lipid-rich pool with an arc of >90 degrees whereas the amount of calcium was expressed as a maximum arc, its length, and maximum thickness.

Within the non-culprit segment of IRA the contours of a lumen, intima layer and media layer were drawn by multiple points trace function on the most proximal frame (IRA

proximal reference [A]), on the most available distal frame (IRA distal reference [L]), on the three frames (10 mm before [B], 5 mm before [C], and at the proximal border of the culprit - D) within the 10-mm adjacent to the culprit lesion proximal segment and on the three frames (10 mm after [I], 5 mm after [J] and at the distal border of the culprit [K]) within the 10-mm distal adjacent segment. The obtained contours were used for the calculation of the areas of the intima, media, intima-media, lumen, and vessel (B1). At the same frames, mean diameters of the intima, media, intima-media, lumen, and vessel were calculated from measurements performed every 90 degrees (B2). Mean values for the adjacent non-culprit region were derived from all measurements obtained from the 10-mm proximal and distal segments. At each analyzed frame, the type of atherosclerotic plaque or lesion was defined as lipid, fibrous, calcified, thick intima, or as a normal wall (Supplementary material, *Figure S1*). The external border of the medial layer was not available for delineation in 1.04% of all OCT frames.

**Long-term clinical follow-up** Data on death, recurrent MI, stroke confirmed by imaging, or unplanned PCI due to unstable angina were collected during follow-up at the outpatient clinic and all of them were included in the composite ischemic endpoint. The data were supplemented by an in-person or telephone interview with the patient, or in the case of death, data was obtained through an immediate relative.

#### **Statistical analysis**

The study was powered to have a 90% chance to demonstrate a 10% relative decrease of ornithine / arginine ratio during 6-month follow-up with a standard deviation of 20% [26, 27]. In the whole group, 44 patients or more were required to demonstrate such a difference with a  $P < 0.05$ , and 88 patients with a  $P < 0.001$ .

Statistical analyses were performed using the SPSS Statistics software (Version 25.0.0.2, IBM, USA). Continuous variables were expressed as a median (interquartile range), whereas categorical variables were shown as a number (percentage). Continuous variables



were first checked for a normal distribution by the Shapiro-Wilk test and differences between MI group and controls were compared by Student's t-test when normally distributed or by the Mann-Whitney U test for non-normally distributed variables. Both normally or non-normally distributed dependent variables in MI group were compared by t-test for paired samples or the Wilcoxon signed-rank test, respectively. In MI group, a relative changes between acute MI phase and follow-up for mean values of arginine metabolites and their ratios have been calculated. Categorical variables were compared by Fisher's exact test. The Pearson or Spearman rank correlation coefficients were calculated to test the association between two variables having a normal or non-normal distribution, respectively. Receiver operating characteristic (ROC) curves and Youden index were used to determine the optimal cut-off value for arginine metabolites and their indices in the prediction of the presence of TCFA within the culprit lesion or a composite ischemic endpoint during follow-up. All independent variables potentially associated with both the exposure and outcome were included in the multivariable logistic regression to determine predictors of the presence of TCFA or included in the multivariable linear regression to find parameters independently associated with the size of the coronary artery intima and intima-media. A two-tailed  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

### **Baseline characteristics**

More than three fourth of MI patients were male and almost half of them had anterior wall STEMI (Table 1). Most patients were in Killip class 1 on admission and almost one third of them had DM. The median time of ischemia was 121 (interquartile range 90 to 309) minutes. At the first contrast injection, 35 (35%) patients had a TIMI-2/3 flow in the IRA while following the procedure a TIMI-3 flow was achieved in 96 (96%) patients. Controls

were less likely to smoke than MI patients and were treated less frequently with aspirin, statins, and beta-blockers, but more often with calcium blockers. In coronary angiography 10 controls had tortuous epicardial segments and 8 myocardial bridge.

### **The altered balance of arginine metabolites in acute versus stable MI phase**

Following ischemia, the median concentration of ornithine was higher by 73% and proline by 76%, the level of arginine was lower by 41%, ADMA by 40%, MMA by 24% and citrulline by 71% ( $P < 0.001$  for all) (Figure 1) when compared to 6-month stable conditions. Compared to stable phase of MI, controls had lower levels of ornithine ( $P < 0.001$ ), proline ( $P = 0.004$ ) and ADMA ( $P = 0.006$ ) without significant differences in arginine ( $P = 0.35$ ), citrulline ( $P = 0.61$ ) (Figure 1).

In the acute phase of MI, the ratios of citrulline/arginine, citrulline/ornithine, and global arginine bioavailability ratio (GABR) were lower while indices of ornithine/arginine proline/arginine were higher as compared with 6-month results ( $P < 0.001$  for all). Compared to stable phase of MI, controls had lower indices of ornithine/arginine ( $P = 0.02$ ) and proline/arginine ( $P = 0.02$ ), higher ratio of citrulline/ornithine ( $P = 0.002$ ) without significant differences in GABR ( $P = 0.13$ ), citrulline/arginine ratio ( $P = 0.10$ ) (Figure 1), arginine/ADMA ( $P = 0.66$ ) and proline/ornithine ( $P = 0.18$ ). There were significant correlations between arginine metabolites at both time points (Supplementary material, *Table S1*).

### **Arginine metabolites and clinical characteristics, lipid profile, inflammatory biomarkers and medications**

At baseline, the concentrations of arginine metabolites and their indices were not associated with body mass index, the time of ischemia, loading dose of a different P2Y12

inhibitor, hsCRP or TIMI flow in the IRA before and after PCI. However, plasma fibrinogen correlated with ornithine ( $R = 0.43, P < 0.001$ ), ornithine/arginine ratio ( $R = 0.23, P = 0.03$ ) and inversely with citrulline/ornithine index ( $R = -0.29, P = 0.005$ ) (Figure 2). In contrast, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol correlated with citrulline/ornithine index ( $R = 0.38, P < 0.001$ ) and inversely with plasma ornithine ( $R = -0.24, P = 0.02$ ). There were no differences in arginine metabolite profile at both time points between patients treated with atorvastatin ( $n = 57$ ) versus rosuvastatin ( $n = 40$ ). In controls, triglyceride concentration inversely correlated with arginine ( $R = -0.42, P = 0.04$ ) and citrulline ( $R = -0.60, P = 0.005$ ) while total cholesterol correlated with ornithine ( $R = 0.40, P = 0.045$ ).

#### **Arginine metabolites and TCFA**

OCT findings are shown in Table 2. Patients with TCFA present in the IRA culprit lesion in an acute phase had higher plasma levels of ADMA ( $P = 0.02$ ), MMA ( $P = 0.03$ ) and ornithine ( $P = 0.003$ ) without changes in the concentration of arginine, citrulline, or proline (Figure 3). Simultaneously, indices of citrulline/ornithine ( $P = 0.003$ ) and arginine/ADMA ( $P = 0.040$ ) were lower and the ornithine/arginine ratio was higher ( $P = 0.045$ ) in patients with TCFA compared with those without TCFA. Patients with TCFA were characterized by higher plasma hsCRP (2.28 [1.08; 3.68] vs 1.23 [0.71; 2.10] mg/dL,  $P = 0.02$ ) and creatinine (86 [76; 95] vs 78 [69; 86]  $\mu$ M,  $P = 0.009$ ) and more frequent diabetes mellitus (36 vs 12%,  $P = 0.03$ ) as compared with patients without TCFA. Moreover, the length of the lipid-rich pool was correlated with the proline level on admission ( $R = 0.24, P = 0.03$ ). Also an acute phase hsCRP correlated with the volume of the culprit lesion ( $R = 0.25, P = 0.04$ ).

### **Arginine metabolites and intima-media of non-culprit IRA segment**

A mean diameter of the intima or intima-media in the adjacent segment of the IRA was higher in males (Supplementary material, *Table S2*) and after 6-month correlated with an ornithine/arginine ratio and inversely correlated with arginine concentration, GABR and citrulline/ornithine ratio (Supplementary material, *Table S3*). Also, a mean diameter of the intima and intima-media of the distal IRA reference segment correlated with the 6-month ornithine/arginine ratio and inversely correlated with the concentrations of arginine, proline, citrulline, and ratios of citrulline/ornithine and proline/arginine. A mean diameter of the media in the distal IRA reference segment inversely correlated with the follow-up levels of arginine, citrulline, proline, and citrulline/ornithine ratio. The more distal segment analyzed the stronger correlations between diameters of intima, intima-media, media and arginine metabolites and their indices were found. The analogous associations for areas of the intima or intima-media are shown in Supplementary material, *Table S3*.

### **Determinants of TCFA presence or the adjacent non-culprit intima-media burden**

Before inclusion in the multivariable models, all significant associations between independent covariates were identified. Age was inversely correlated with the hemoglobin level ( $R = -0.29$ ,  $P = 0.01$ ) and the median plasma creatinine was higher by 19% ( $P = 0.003$ ) in males versus females. Diabetic patients had a higher median concentration of creatinine by 11% ( $P = 0.02$ ) and of hsCRP by 45% ( $P = 0.023$ ).

By multivariable logistic regression, a higher baseline creatinine level ( $P = 0.03$ ) and a lower baseline citrulline / ornithine ratio ( $P = 0.006$ ) influenced the presence of TCFA in the culprit lesion (Table 3). The citrulline / ornithine ratio reached the area under the ROC curve of 0.77 (95% CI 0.66–0.88) for prediction of TCFA with a cut-off value of  $\leq 0.12$ , and a sensitivity of 89.0% and specificity of 57.1% (Supplementary material, *Figure S2A*).

Simultaneously, by multivariable analysis, male gender ( $P < 0.001$ ), DM ( $P = 0.02$ ) and a higher 6-month ornithine/arginine ratio ( $P = 0.02$ ) were independently associated with a higher mean intima-media diameter in the adjacent IRA segment. The same predictors independently influenced the mean intima diameter in a similar way (Table 3).

#### **A signal of long-term clinical outcomes**

Of 100 MI patients, within the median follow-up of 23 (16–35) months, 4 patients died including 2 before discharge, recurrent MI occurred in 4 survivors, stroke in 3 patients, and unplanned PCI due to unstable angina was performed in another 3 patients. The composite ischemic endpoint was found in 14 patients. Of all the arginine metabolites and their metabolic indices, follow-up GABR was lower while ornithine/arginine ratio was higher in patients with versus without an ischemic composite endpoint (Supplementary material, *Table S4*). The follow-up ornithine/arginine ratio reached the area under the ROC curve of 0.80 (95% CI 0.68–0.91) for prediction of composite ischemic endpoint with a cut-off value of  $\geq 0.57$ , and a sensitivity of 74.1% and specificity of 78.0% (Supplementary material, *Figure S2B*).

#### **Discussion**

The current study is the first to demonstrate that a shift of arginine metabolism towards the pathway catalyzed by arginase instead of NOS in the acute phase of MI is associated with the presence of TCFA in the culprit region of IRA (Figure 4). During the stable chronic phase in patients receiving optimal pharmacotherapy, analogous persistent alterations correlate both with the size of intima or intima-media in the adjacent non-culprit segment of IRA. After adjustment to clinical characteristics, the parameters of the balance of arginine metabolites both in the acute and chronic phase were found to be independent predictors of the structure

of the culprit and non-culprit IRA regions, respectively. Our findings suggest that an altered balance of arginine metabolites might be considered as an indicator of the presence of vulnerable plaque as well as of the extent of the atherosclerotic burden in the IRA segment adjacent to the culprit lesion.

The experimental studies indicate that the expression of arginase I in ischemic and reperfused myocardium is higher as compared to the remote region [31] and is associated with an increased vascular production of superoxide anion and / or decreased endothelial levels of tetrahydrobiopterin or L-arginine resulting in diminished NO synthesis [32, 33]. Increased arginase expression after ischemia / reperfusion was also found in coronary artery endothelial cells and vascular smooth muscle cells [26, 34]. Our current and previous [27] clinical findings are in line with the experimental studies and provide indirect but consistent arguments for a relatively enhanced activation of arginase over NOS in patients with acute MI. In a rat model of myocardial ischemia/reperfusion, Schreckenberget al[35] demonstrated that enhanced arginase activity initially triggered by endothelial NOS uncoupling starts within 2 hours of reperfusion, and is maintained by a TNF-alpha dependent induction of arginase-1 and a down-regulation of endothelial NOS. Apart from arginase overexpression, endothelial NOS uncoupling and increased activation of inducible NOS in acute phase of MI must be considered when describing the shift of L-arginine utilization [1,5] (Figure 4).

A fragile TCFA within a coronary plaque prone to rupture, erosion, or ulceration is a trigger for thrombus formation [36-37]. Plaque vulnerability associated with a vascular smooth muscle cell apoptosis induced by arginase II was found in a cell culture model as well as in atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient mice [38]. In mice, increased carotid arginase activity was associated with enhanced shear stress, and newly formed atherosclerotic plaques had a vulnerable-like phenotype with a decreased number of smooth muscle cells, a lower collagen content, and a higher content of macrophages and lipid [39]. Keeping in mind

all the limitations associated with *in vitro* studies and *in vivo* animal models, we have shown for the first time in humans that the presence of a TCFA in the culprit lesion is associated with a shift of arginine metabolism towards arginase expressed as an increased ornithine/arginine ratio and decreased citrulline/ornithine ratio following ischemia. Although expected, there were no differences in baseline proline levels between patients with and without TCFA, likely due to high plasma proline concentration released from the disrupted cardiomyocytes in acute phase of MI.

Looking for accurate, non-invasive, and reproducible biomarkers of atherosclerosis progression, including its asymptomatic and very early stages associated with endothelial dysfunction, is of clinical importance [40]. Previous studies showed that during 9-18 months observation regression of atherosclerotic plaque associated with potent lipid-lowering therapy was low reaching less than 2.2% of baseline volume [20-25]. Therefore, we compared baseline OCT findings with a 6-month profile of arginine metabolites. In patients without any adverse cardiac ischemic events during follow-up, persistent metabolic shift towards arginase correlated with increased thickness of the coronary intima or intima-media complex in the adjacent non-culprit segments of the IRA. Arginase as a source of polyamines and L-proline promotes intimal hyperplasia and coronary artery remodeling [41]. In contrast, arginase inhibition leads to a significant decline in vascular smooth muscle cells, DNA synthesis, and a reduced intimal thickening [42]. Previous studies showed an association between higher intima-media hyperplasia and an increased endothelial cell concentration of NOS inhibitors [43], or with enhanced arginase activity [44]. A preserved endothelial function, as measured by flow-mediated dilatation, inversely correlated with the plasma ADMA and hsCRP concentration [45]. Future studies on the role of genetic background for arginase functioning are needed to establish causal relevance of these potential pathways [46]. This study provides a clinical signal for potential reevaluation of existing arginase inhibitors as well as for

development of the novel therapeutic molecules interfering arginine metabolism in the treatment of MI patients.

This study has several limitations. First, the analyzed group is of medium size, although sample size was calculated based on rigorous assumptions derived from meticulously measured OCT parameters and arginine metabolites. Second, arginine as well as NO metabolites [47] were not measured in the acute phase following reperfusion. Third, our results have limited predictive clinical value due to the small number of endpoints observed during follow-up nevertheless this study was not powered for clinical events [48, 49]. Finally, as the majority of patients have been treated with statins or angiotensin-converting-enzyme inhibitors/angiotensin receptor blockers we cannot assess the effect of lipid-lowering or blood pressure lowering therapy on the arginine metabolites profile.

In conclusion, our findings provide arguments that during the acute phase of MI, arginine metabolism is shifted from NOS towards arginase, as compared to stable conditions. Simultaneously, our results suggest that an enhanced arginase activity upon admission is associated with the presence of TCFA in the culprit lesion and might indicate patients who are more likely to have vulnerable plaque, while a similar residual metabolic shift in the chronic phase is correlated with the thickness of intima-media in the adjacent to the culprit IRA segment. These new indices derived from arginine metabolism might be useful as indicators of acute and chronic features of atherosclerosis, although their validation in a larger cohort focusing on clinical additive utility to standard risk variables, as well as impact of these measures by lifestyle, diet and medical therapy is required.

**Supplementary material** Supplementary material is available at [www.mp.pl/paim](http://www.mp.pl/paim).



### **Article information**

**Contribution statement** PM and JZ contributed to the concept and design of the study.

All authors were involved in data collection. JZ analyzed the data and coordinated funding.

All authors edited and approved the final version of the manuscript.

**Acknowledgments** None.

**Funding** This work was supported by the grant of National Science Center of Poland (2016/21/B/NZ5/01378 to J.Z.).

**Conflict of interest** None declared.

### **References**

- 1 Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric oxide and endothelial dysfunction. *Crit Care Clin.* 2020; 36: 307-321.
- 2 Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 2007; 115: 1285-1295.
- 3 Morris SM Jr. Arginine metabolism revisited. *J Nutr.* 2016; 146: 2579S-2586S.
- 4 Caldwell RW, Rodriguez PC, Toque HA, et al. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease. *Physiol Rev.* 2018; 98: 641-665.
- 5 Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012; 33: 829-837.
- 6 Imiela T, Imiela AM, Karczmarewicz G, Budaj A. Acidic urine as a novel risk factor for diuretic resistance and worse in-hospital prognosis in patients with acute heart failure. *Pol Arch Intern Med.* 2021; 131: 16054.
- 7 Vichova T, Waldauf P, Karpisek M, et al. Oxidative stress markers, thioredoxin I and 8-isoprostane, in relation to ischemic time in patients with ST-segment elevation myocardial

- infarction treated by primary percutaneous coronary intervention. *Pol Arch Intern Med.* 2021; 131: 755-758.
- 8 Simsek B, Cınar T, Tanık VO, et al. The association of acute-to-chronic glyceic ratio with no-reflow in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Kardiol Pol.* 2021; 79: 170-178.
- 9 Tabas I, Williams KJ, Boren J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation.* 2007; 116: 1832-1844.
- 10 Libby P, Lichtman AH, Hansson GK. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans. *Immunity.* 2013; 38: 1092-1104.
- 11 Ridker PM. A test in context: high-sensitivity c-reactive protein. *J Am Coll Cardiol.* 2016; 67: 712-723.
- 12 Möhlenkamp S, Lehmann N, Moebus S, et al. Quantification of coronary atherosclerosis and inflammation to predict coronary events and all-cause mortality. *J Am Coll Cardiol.* 2011; 57: 1455-1464.
- 13 Terlecki M, Kocowska-Trytko M, Plens K, et al. Prognostic value of acid-base balance parameters assessed on admission in peripheral venous blood of patients with myocardial infarction treated with percutaneous coronary intervention. *Pol Arch Intern Med.* 2022; 132: 16229.
- 14 Cao J, Hsu Y-H, Li S, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) interacts with phospholipid vesicles via a surface-disposed hydrophobic  $\alpha$ -helix. *Biochemistry.* 2011; 50: 5314-5321.
- 15 Mittal EB, Mishra A, Srivastava A, et al. Matrix metalloproteinases in coronary artery disease. *Adv Clin Chem.* 2014; 64: 1-72.
- 16 Ndrepepa G, Braun S, Mehilli J, et al. Myeloperoxidase level in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes. *Eur J Clin Invest.* 2008; 38: 90-96.

- 17 Dong L, Mintz GS, Witzendichler B, et al. Comparison of plaque characteristics in narrowings with ST-elevation myocardial infarction (STEMI), non-STEMI/unstable angina pectoris and stable coronary artery disease (from the ADAPT-DES IVUS Substudy). *Am J Cardiol.* 2015; 115: 860-866.
- 18 Gili S, Iannaccone M, Colombo F, et al. Effects of statins on plaque rupture assessed by optical coherence tomography in patients presenting with acute coronary syndromes: insights from the optical coherence tomography (OCT)-FORMIDABLE registry. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2018; 19: 524-531.
- 19 Homorodean C, Leucuta DC, Ober M, et al. Intravascular ultrasound insights into the unstable features of the coronary atherosclerotic plaques: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest.* 2022; 52: e13671.
- 20 Hou J, Xing L, Jia H, et al. Comparison of intensive versus moderate lipid lowering therapy on fibrous cap and atheroma volume of coronary lipid rich plaque using serial optical coherence tomography and intravascular ultrasound imaging. *Am J Cardiol.* 2016; 117: 800-806.
- 21 Räber L, Koskinas KC, Yamaji K, et al. Changes in coronary plaque composition in patients with acute myocardial infarction treated with high intensity statin therapy (IBIS 4): a serial optical coherence tomography study. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2019; 12: 1518-1528.
- 22 Yano H, Horinaka S, Ishimitsu T. Effect of evolocumab therapy on coronary fibrous cap thickness assessed by optical coherence tomography in patients with acute coronary syndrome. *J Cardiol.* 2020; 75: 289-295.
- 23 Räber L, Ueki Y, Otsuka T, et al. Effect of alirocumab added to high-intensity statin therapy on coronary atherosclerosis in patients with acute myocardial infarction: the PACMAN-AMI randomized clinical trial. *JAMA.* 2022; 3: e225218.

- 24 Tsujita K, Sugiyama S, Sumida H, et al. Impact of dual lipid-lowering strategy with ezetimibe and atorvastatin on coronary plaque regression in patients with percutaneous coronary intervention: the multicenter randomized controlled PRECISE-IVUS Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2015; 66: 495-507.
- 25 Nicholls SJ, Puri R, Anderson T, et al. Effect of evolocumab on coronary plaque composition. *J Am Coll Cardiol*. 2018; 72: 2012-2021.
- 26 Jung C, Gonon AT, Sjöquist P-O, et al. Arginase inhibition mediates cardioprotection during ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2010; 85: 147-154.
- 27 Molek P, Zmudzki P, Włodarczyk A, et al. The shifted balance of arginine metabolites in acute myocardial infarction patients and its clinical relevance. *Sci Rep*. 2021; 11: 83.
- 28 Zalewski J, Zmudka K, Musialek P, et al. Detection of microvascular injury by evaluating epicardial blood flow in early reperfusion following primary angioplasty. *Int J Cardiol*. 2004; 96: 389-396.
- 29 Sinclair H, Bourantas C, Bagnall A, et al. OCT for the identification of vulnerable plaque in acute coronary syndrome. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2015; 8: 198-209.
- 30 Tearney GJ, Regar E, Akasaka T. Consensus standards for acquisition, measurement, and reporting of intravascular optical coherence tomography studies: a report from the International Working Group for Intravascular Optical Coherence Tomography Standardization and Validation. *J Am Coll Cardiol*. 2012; 59: 1058-1072.
- 31 Lefer AM, Tsao PS, Lefer DJ, et al. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J*. 1991; 5: 2029-2034.
- 32 Tiefenbacher CP, Chilian WM, Mitchell M, DeFily DV. Restoration of endothelium-dependent vasodilation after reperfusion injury by tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 1996; 94: 1423-1429.

- 33 Weyrich AS, Ma X, Lefer AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation*. 1992; 86: 279-288.
- 34 Pernow J, Jung C. Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? *Cardiovasc Res*. 2013; 98: 334-343.
- 35 Schreckenber R, Weber P, Cabrera-Fuentes HA, et al. Mechanism and consequences of the shift in cardiac arginine metabolism following ischaemia and reperfusion in rats. *Thromb Haemost*. 2015; 113: 482-493.
- 36 Garcia-Garcia HM, Jang IK, Serruys PW, et al. Imaging plaques to predict and better manage patients with acute coronary events. *Circ Res*. 2014; 114: 1904-1917.
- 37 Iwańczyk S, Skorupski WJ, Kępski S, et al. Thromboembolic or atherosclerotic? Optical coherence tomography in determining the cause of myocardial infarction with ST-segment elevation. *Kardiol Pol*. 2020; 78: 1045-1046.
- 38 Xiong Y, Yu Y, Montani JP, et al. Arginase-II induces vascular smooth muscle cell senescence and apoptosis through p66Shc and p53 independently of its L-arginine ureahydrolase activity: implications for atherosclerotic plaque vulnerability. *J Am Heart Assoc*. 2013; 2: e000096.
- 39 Olivon VC, Fraga-Silva RA, Segers D, et al. Arginase inhibition prevents the low shear stress-induced development of vulnerable atherosclerotic plaques in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Atherosclerosis*. 2013; 227: 236-243.
- 40 Almeida SO, Budoff M. Effect of statins on atherosclerotic plaque. *Trends Cardiovasc Med*. 2019; 29: 451-455.
- 41 Yang Z, Ming XF. Endothelial arginase: a new target in atherosclerosis. *Curr Hypertens Rep*. 2006; 8: 54-59.
- 42 Wei LH, Wu G, Morris SM Jr, et al. Elevated arginase I expression in rat aortic smooth muscle cells increases cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 9260-9264.

- 43 Peyton KJ, Ensenat D, Azam MA, et al. Arginase promotes neointima formation in rat injured carotid arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29: 488-494.
- 44 Azuma H, Sato J, Hamasaki H, et al. Accumulation of endogenous inhibitors for nitric oxide synthesis and decreased content of L-arginine in regenerated endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 195; 115: 1001-1004.
- 45 Ishizaka M, Nagai A, Iwanaga M, et al. Possible involvement of enhanced arginase activity due to up-regulated arginases and decreased hydroxyarginine in accelerating intimal hyperplasia with hyperglycemia. *Vascul Pharmacol.* 2007; 47: 272-280.
- 46 Mangiacapra F, Conte M, Demartini C, et al. Relationship of asymmetric dimethylarginine (ADMA) with extent and functional severity of coronary atherosclerosis. *Int J Cardiol.* 2016; 220: 629-633.
- 47 Janssens SP, Bogaert J, Zalewski J, et al. NOMI investigators. Nitric oxide for inhalation in ST-elevation myocardial infarction (NOMI): a multicentre, double-blind, randomized controlled trial. *Eur Heart J.* 2018; 39: 2717-2725.
- 48 Jankowski P, Topór-Mądry R, Gąsior M, et al. Management and predictors of clinical events in 75 686 patients with acute myocardial infarction. *Kardiol Pol.* 2022; 80: 468-475.
- 49 Wojtyniak B, Gierlotka M, Opolski G, et al. Observed and relative survival and 5-year outcomes of patients discharged after acute myocardial infarction: the nationwide AMI-PL database. *Kardiol Pol.* 2020; 78: 990-998.

<b>Table 1</b> Baseline and in-hospital characteristics			
	<b>MI patients, n =</b> <b>100</b>	<b>Controls, n =</b> <b>25</b>	<b>P</b> <b>value</b>
Age	62 (54; 69)	64 (60; 69)	0.17
Male gender	78 (78.0)	18 (72.0)	0.30

Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	27.6 (25.2; 31.0)	28.5 (26.3; 31.9)	0.66
Anterior wall myocardial infarction	49 (49.0)	-	-
Killip class >1 on admission	5 (5.0)	-	-
Cardiovascular risk factors			
Hypertension	79 (79)	22 (88)	0.40
Diabetes mellitus	30 (30)	5 (20)	0.46
Dyslipidemia	68 (68)	21 (84)	0.14
Smoking	52 (52)	4 (16)	0.004
Family history of coronary artery disease	42 (42)	10 (40.0)	0.98
Comorbidities			
Prior myocardial infarction	9 (9.0)	0	0.20
Prior percutaneous coronary intervention	6 (6.0)	0	0.60
History of stroke	3 (3.0)	1 (4.0)	0.36
History of peripheral vascular disease	1 (1.0)	0	0.99
Chronic kidney disease	6 (6.0)	1 (4.0)	0.99
Baseline laboratory results			
Hemoglobin, g/dL	15.1 (14.1; 16.0)	14.4 (13.4; 14.9)	0.11
Hematocrit, %	44.2 (42.0; 47.1)	43.0 (40.5; 44.6)	0.09
Platelets, ×10 <sup>3</sup> /μL	235 (203; 283)	232 (191; 246)	0.21
White blood cells, ×10 <sup>3</sup> /μL	10.1 (8.3; 13.1)	6.0 (5.7; 7.4)	<0.001
Glucose, mmol/L	8.2 (7.0; 10.0)	5.4 (5.2; 6.1)	<0.001
Creatinine, μmol/L	84 (75; 93)	76 (63; 93)	0.19
High sensitivity C-reactive protein, mg/L	2.21 (1.08; 3.64)	1.95 (0.78; 2.33)	0.23
Fibrinogen, g/L	3.53 (3.16; 3.99)	3.21 (2.95; 4.10)	0.67

Total cholesterol, mmol/L	5.28 (4.52; 6.23)	4.71 (4.16; 5.00)	0.007
LDL cholesterol, mmol/L	3.60 (2.96; 4.34)	2.78 (2.20; 3.45)	<0.001
HDL cholesterol, mmol/L	1.27 (1.06; 1.56)	1.45 (1.10; 1.78)	0.12
Triglycerides, mmol/L	1.68 (1.01; 2.54)	1.50 (1.20; 2.19)	0.34
Troponin T, ng/mL	0.087 (0.022; 0.284)	–	–
Isoenzyme MB of creatine kinase, IU/L	21.0 (16.0; 38.5)	–	–
Antithrombotic treatment before admission			
Aspirin, loading dose of 300 mg p.o.	100 (100)	–	–
Ticagrelor, loading dose of 180 mg p.o.	75 (75)	–	–
Clopidogrel, loading dose of 600 mg p.o.	25 (25)	–	–
Treatment at discharge			
Aspirin	98 (98)	21 (84)	0.02
Clopidogrel	10 (10)	–	–
Ticagrelor	86 (86)	–	–
Prasugrel	4 (4)	–	–
ACEI or ARB	88 (88)	18 (72)	0.07
Beta-blocker	97 (97)	17 (68)	<0.001
Calcium blocker	9 (9)	10 (40)	0.009
Statin	97 (97)	20 (80)	0.008
Data are shown as median (interquartile range) or number (percentage)			
Abbreviations: ACEI, angiotensin-converting-enzyme inhibitors; ARB, angiotensin receptor blockers; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein			



**Table 2** The infarct-related artery characteristics in the optical coherence tomography

Culprit lesion		Non-culprit segment of the IRA			
Parameter		Parameter	Proximal	Adjacent*	Distal
Vessel volume, mm <sup>3</sup>	329 (237; 441)	Areas, mm <sup>2</sup>			
Lumen volume, mm <sup>3</sup>	106 (77; 156)	Vessel	19.8 (16.5; 23.8)	15.1 (12.0; 18.1)	7.7 (5.9; 9.9)
Lesion volume, mm <sup>3</sup>	219 (150; 310)	Lumen	11.3 (9.2; 15.3)	7.7 (6.1; 9.5)	4.1 (3.0; 5.4)
Thrombus volume, mm <sup>3</sup>	2.0 (0.5; 5.1)	Intima	5.9 (3.8; 8.2)	4.9 (3.6; 6.5)	2.0 (1.0; 3.3)
Lesion length, mm	22.5 (17.1; 29.4)	Media	2.0 (1.7; 2.3)	1.7 (1.4; 2.0)	1.0 (0.7; 1.4)
Minimum lumen area, mm <sup>2</sup>	1.1 (0.8; 1.4)	Intima-media	7.8 (5.8; 10.4)	6.7 (5.3; 8.2)	3.1 (1.8; 4.5)
The cause of IRA occlusion:		Areas as a ratio of vessel area			
Plaque rupture	30 (30)	Lumen	0.60 (0.51; 0.71)	0.55 (0.48; 0.60)	0.59 (0.49; 0.69)
Plaque erosion	49 (49)	Intima	0.28 (0.18; 0.40)	0.33 (0.28; 0.40)	0.26 (0.19; 0.37)
Spontaneous dissection	14 (14)	Media	0.09 (0.08; 0.11)	0.12 (0.10; 0.13)	0.13 (0.12; 0.16)
Tight stenosis	7 (7)	Intima-media	0.40 (0.29; 0.49)	0.44 (0.39; 0.52)	0.41 (0.31; 0.51)
Necrotic core	49 (49)	Mean diameters, mm			
Macrophages infiltration	88 (88)	Vessel	5.02 (4.59; 5.50)	4.30 (3.90; 4.77)	3.13 (2.74; 3.55)

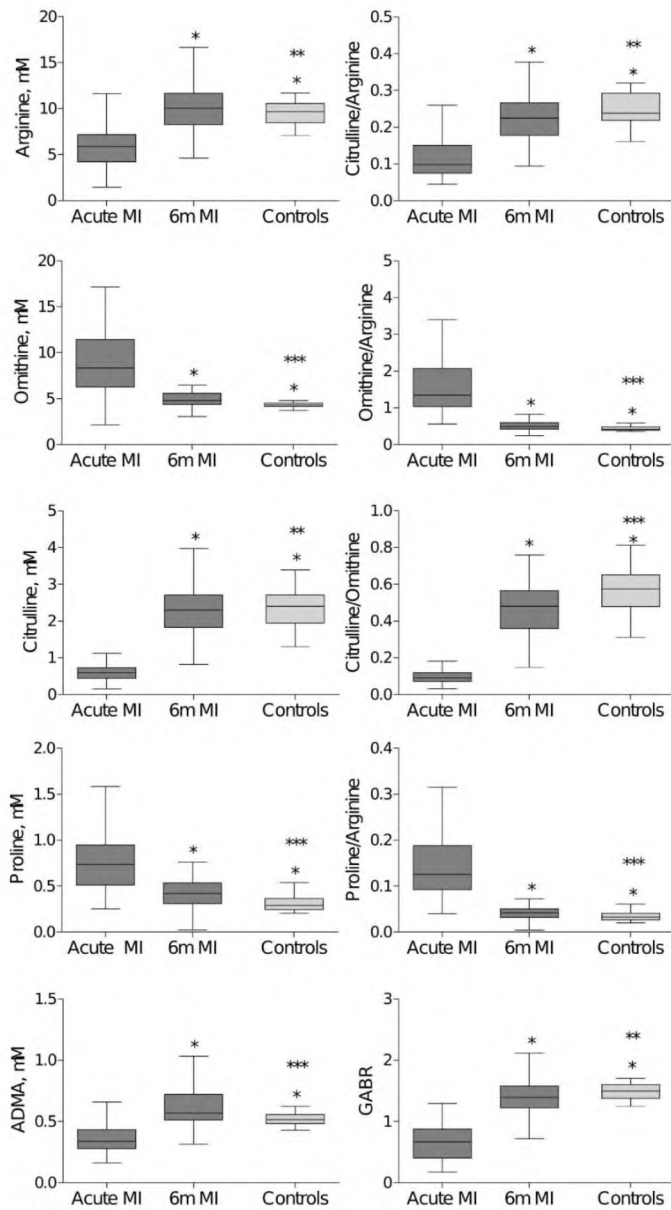
Vasa vasorum	36 (36)	Lumen	3.81 (3.44; 4.41)	3.09 (2.71; 3.42)	2.28 (1.96; 2.61)
Intramural hematoma	30 (30)	Intima	0.42 (0.30; 0.67)	0.47 (0.34; 0.58)	0.25 (0.16; 0.39)
Thin-cap fibroatheroma	75 (78)	Media	0.12 (0.10; 0.14)	0.13 (0.11; 0.15)	0.10 (0.08; 0.13)
Ruptured	44 (44)	Intima-media	0.55 (0.41; 0.78)	0.62 (0.46; 0.72)	0.38 (0.24; 0.52)
Non-ruptured	31 (31)	Mean diameters as a ratio of vessel mean diameter			
Lipid-rich pool lesion	81 (81)	Lumen	0.78 (0.71; 0.84)	0.73 (0.68; 0.77)	0.77 (0.69; 0.83)
Length of lipid-rich pool	12.3 (7.9; 17.0)	Intima	0.08 (0.06; 0.13)	0.11 (0.09; 0.13)	0.08 (0.06; 0.12)
Calcified lesion	35 (35)	Media	0.023 (0.021; 0.030)	0.030 (0.027; 0.034)	0.036 (0.03; 0.042)
maximum arcus, °	136 (109; 202)	Intima-media	0.12 (0.08; 0.16)	0.14 (0.12; 0.16)	0.12 (0.09; 0.16)
maximum length, mm	4.8 (2.9; 8.8)				
maximum thickness, mm	0.92 (0.75; 1.19)				
The dominant component of culprit lesion		The dominant type of non-culprit lesion			
Thrombus	18 (18)	Thick intima	5 (5)	6 (6)	7 (7)
Lipid	54 (54)	Lipid	40 (40)	50 (50)	12 (12)
Fibrous lesion	19 (19)	Fibrous lesion	11 (11)	28 (28)	36 (36)
Calcified lesion	9 (9)	Calcified lesion	6 (6)	5 (5)	1 (1)

		Normal segment	36 (36)	11 (11)	44 (44)
Data are shown as median (interquartile range) or number (percentage)					
a mean values calculated for all measurements performed within 10-mm segments adjacent proximally and distally to the culprit					
Abbreviations: IRA, infarct-related artery					

**Table 3** The independent predictors of the presence of thin-cap fibroatheroma in the culprit lesion and of the thickness of intima or intima-media in the adjacent to the culprit region

Independent variables	Univariable model				Multivariable model			
	Presence of TCFA in the culprit lesion, Nagelkerke $R^2 = 0.29$ , $P < 0.001$							
	OR	<i>P</i> value	95% CI for OR		OR	<i>P</i> value	95% CI for OR	
Diabetes mellitus, yes vs no	3.891	0.04	1.050	14.286	3.086	0.12	0.750	12.658
Creatinine, per 1 $\mu\text{mol/L}$	1.048	0.02	1.009	1.089	1.049	0.03	1.004	1.096
Citrulline/Ornithine, per 0.01	0.979	0.005	0.965	0.994	0.978	0.006	0.962	0.994
	Mean intima-media diameter of the adjacent segment, $R^2 = 0.39$ , $P < 0.001$							
	beta	<i>P</i> value	95% CI for beta		beta	<i>P</i> value	95% CI for beta	
Age, per 1 year	0.218	0.03	0.017	0.412	0.197	0.05	-0.002	0.394

Male gender, no vs yes	0.313	0.002	0.118	0.508	0.399	<0.001	0.212	0.585
Diabetes mellitus, no vs yes	0.293	0.004	0.095	0.491	0.222	0.02	0.030	0.414
Ornithine / Arginine, per 0.01	0.337	0.003	0.112	0.561	0.227	0.02	0.045	0.409
	Mean intima diameter of the adjacent segment, $R^2 = 0.35$ , $P < 0.001$							
	beta	<i>P</i> value	95% CI for beta		beta	<i>P</i> value	95% CI for beta	
Age, per 1 year	0.079	0.18	-0.021	0.383	0.175	0.08	-0.023	0.373
Male gender, no vs yes	0.353	<0.001	0.160	0.546	0.434	<0.001	0.247	0.620
Diabetes mellitus, no vs yes	0.264	0.01	0.064	0.464	0.203	0.04	0.012	0.394
Ornithine / Arginine, per 0.01	0.291	0.009	0.085	0.497	0.218	0.02	0.036	0.412
Abbreviations: beta, coefficient; CI, confidence interval; OR, odds ratio; TCFA, thin-cap fibroatheroma								



**Figure 1** Arginine metabolites and their indices in compared groups. Box plot shows median and interquartile range (IQR) (Q3 to Q1). Q1 and Q3 are the first and third quartiles. Whiskers are drawn at  $Q3 + 1.5 \times IQR$ ,  $Q1 - 1.5 \times IQR$ . Extreme values are omitted.

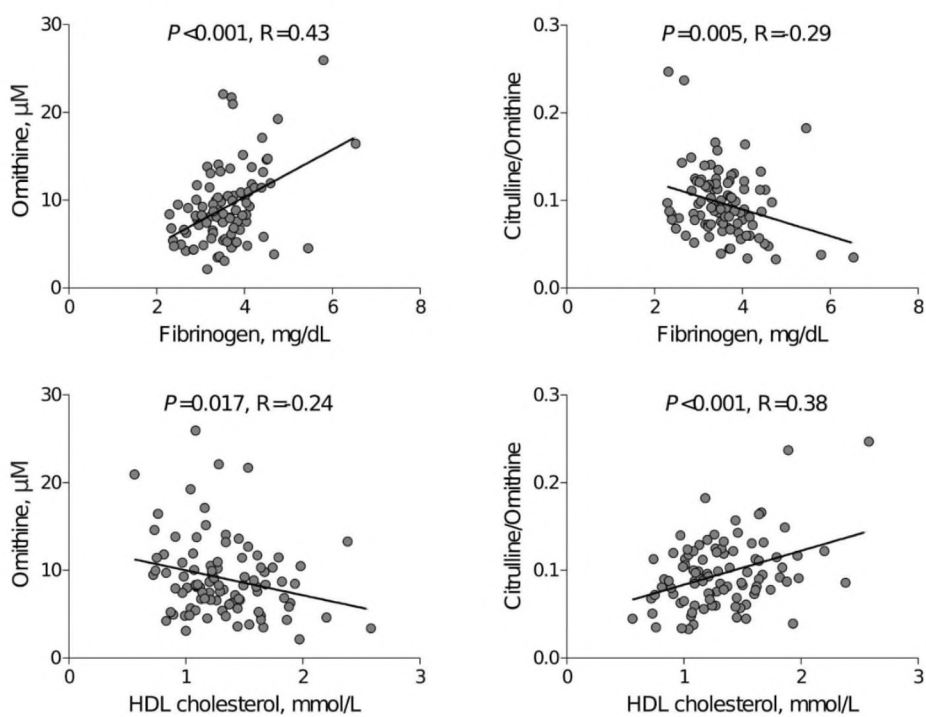
**Abbreviations:** 6m MI, 6 months after MI; Acute MI, acute phase of myocardial infarction;

ADMA, asymmetric dimethylarginine; GABR, global arginine bioavailability ratio

\*  $P < 0.001$  versus Acute MI

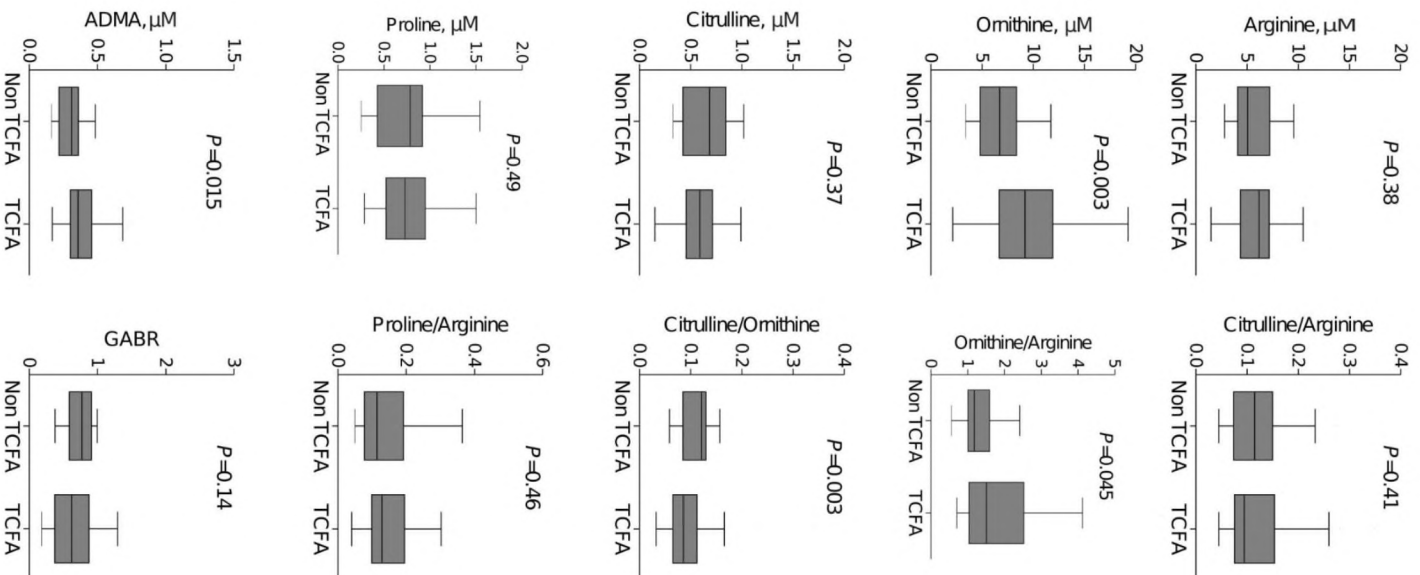
\*\*  $P \geq 0.05$  versus 6m MI

\*\*\*  $P < 0.05$  versus 6m MI



**Figure 2** Arginine metabolites, their indices versus traditional cardiovascular biomarkers measured in acute phase of myocardial infarction.

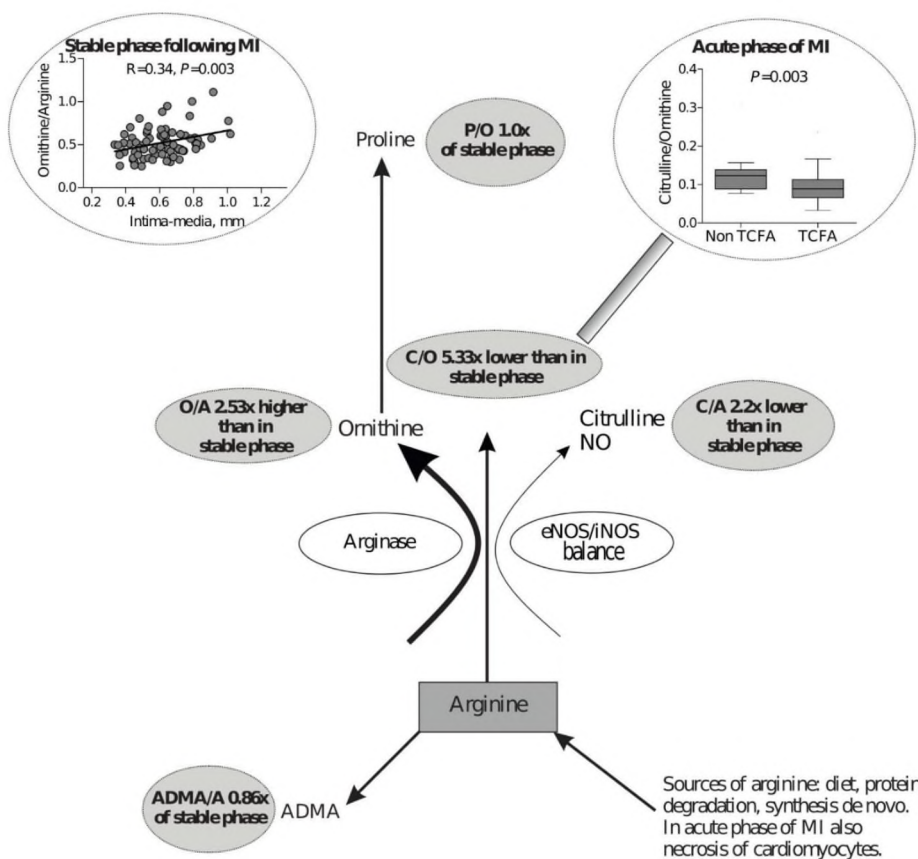
**Abbreviations:** HDL cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol; r, correlation coefficient



**Figure 3** Arginine metabolites and their indices in patients with and without TCFA.

Box plot shows median and interquartile range (IQR) (Q3 to Q1). Q1 and Q3 are the first and third quartiles. Whiskers are drawn at  $Q3 + 1.5 \times IQR$ ,  $Q1 - 1.5 \times IQR$ . Extreme values are omitted.

**Abbreviations:** ADMA, asymmetric dimethylarginine; GABR, global arginine bioavailability ratio; TCFA, thin-cap fibroatheroma



**Figure 4** An altered arginine metabolites balance in acute phase of myocardial infarction and its relationships.

**Abbreviations:** plasma concentration of: A, arginine; ADMA, asymmetric dimethylarginine; C, citrulline; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MI, myocardial infarction; O, ornithine; P, proline; TCFA, thin-cap fibroatheroma

**Short title:** Infarct-related artery intima-media and plasma arginine

5.3. Publikacja 3: *„Simultaneous cardiac free wall rupture and ventricular septal rupture following acute myocardial infarction treated with emergency balloon closure”*





# Coronary artery dissection following aortic valve replacement. How can one deal with this rare yet life-threatening complication?

Patrycja Molek MD | Jadwiga Nessler MD, PhD | Jaroslaw Zalewski MD, PhD

Department of Coronary Artery Disease and Heart Failure, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

## Correspondence

Jaroslaw Zalewski, MD, PhD, Department of Coronary Artery Disease and Heart Failure, Jagiellonian University Medical College, 80 Pradnicka Street, 31-202 Krakow, Poland.  
Email: jzalews@szpitaljp2.krakow.pl

## Funding information

Jagiellonian University Medical College, Grant/Award Number: K/ZDS/006441; National Science Centre Poland, Grant/Award Number: 2016/21/B/NZ5/01378

## Abstract

Coronary artery dissection following its cannulation for cardioplegia administration as a result of aortic valve replacement (AVR) is a rare but nevertheless life-threatening complication. The three cases of a patient suffering from aortic stenosis illustrated below focus on the issue of how to identify and treat the dissected artery. In all of the patients who had undergone AVR diagnosed was a periprocedural myocardial infarction. Angiography revealed the dissection of the left main in two of the patients, while in the third one that of the right coronary artery. In the case of local dissection, angiography was sufficient to identify the true lumen, whereas in a dissection encompassing the whole of the coronary tree it was necessary to either find the coronary artery not involved in the dissection or to perform intravascular ultrasound imaging. After true lumen identification, the entry of dissection was stented with the optimal angiographic result.

## KEYWORDS

aortic valve replacement, coronary artery dissection, true lumen

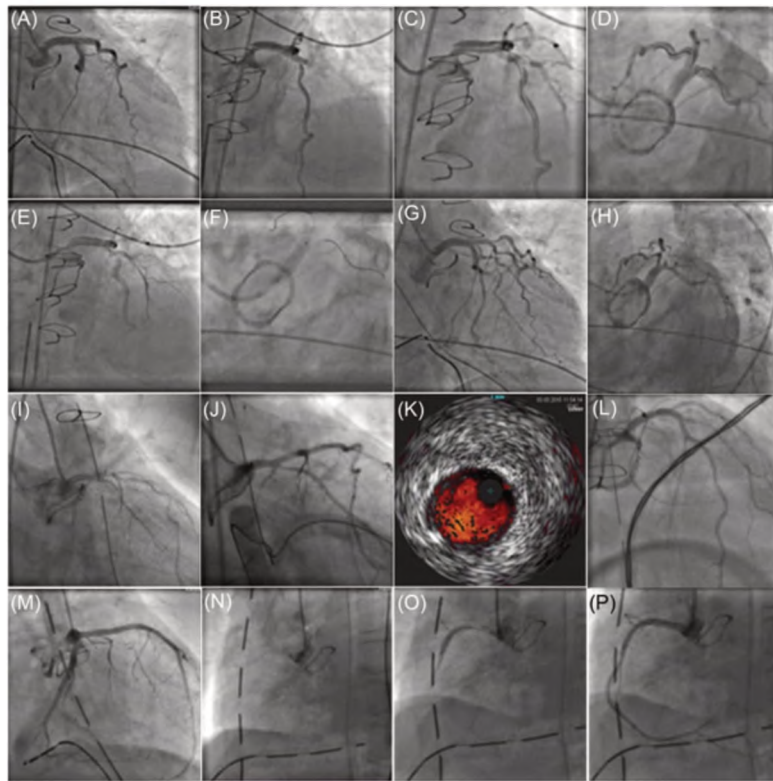
## 1 | INTRODUCTION

Aortic stenosis (AS) is the most frequent valvular disease in the elderly and surgical aortic valve replacement (AVR) is the treatment of choice.<sup>1</sup> During AVR performed by means of a cardiopulmonary bypass (CPB) antegrade cardioplegia is delivered either indirectly to the aortic root, or selectively to the ostium of the coronary artery. Complications related to this procedure are uncommon but may include coronary artery dissection. Although this complication is rare and potentially lethal, little data addressing this issue have been collected.<sup>2,3</sup> Below we shall focus on how to identify and treat the true lumen of the dissected artery. Here we illustrated three cases suffering from iatrogenic coronary artery dissection after its cannulation for cardioplegia administration directly into coronary ostia.

## 2 | CASE SERIES

The first patient is a 78-year-old female with severe, symptomatic, rheumatic aortic valve stenosis. According to The European System for

Cardiac Operative Risk Evaluation (EUROSCORE II) (1.9%) and Society of Thoracic Surgeons (STS) (2.32%), the risk of surgery was moderate. She underwent AVR with a biological Sorin Mitroflow 21A valve (LivaNova PLC, London, UK) using the ministernotomy approach with CPB. The first day following AVR, the patient displayed highly elevated cardiac enzymes (the maximum troponin T was 16.74 ng/mL with the upper level of the normal range being 0.014 ng/mL). As a result of signs of myocardial infarction (MI), coronary angiography was performed, and showed a dissection beginning in the left main (LM), passing through the left anterior descending (LAD) artery, with occlusion of the proximal left circumflex (LCx) artery, and occlusion of the first diagonal branch (Dgl) (Figure 1A and 1B). After the wiring of the proximal LAD and LCx blood flow was restored in the left coronary system (Figure 1C and 1D). However, the patient was not stable enough for intravascular ultrasound (IVUS) imaging in order to detect the true lumen. Yet, we discovered that the only artery not involved in the dissection was Dgl, here closed at the baseline. After a few attempts, the guidewire was successfully inserted into the Dgl (Figure 1E) and a stent was implanted in the LM on the wire in the Dgl branch (Figure 1F), while the entry of dissection was closed with good epicardial flow despite the persistent



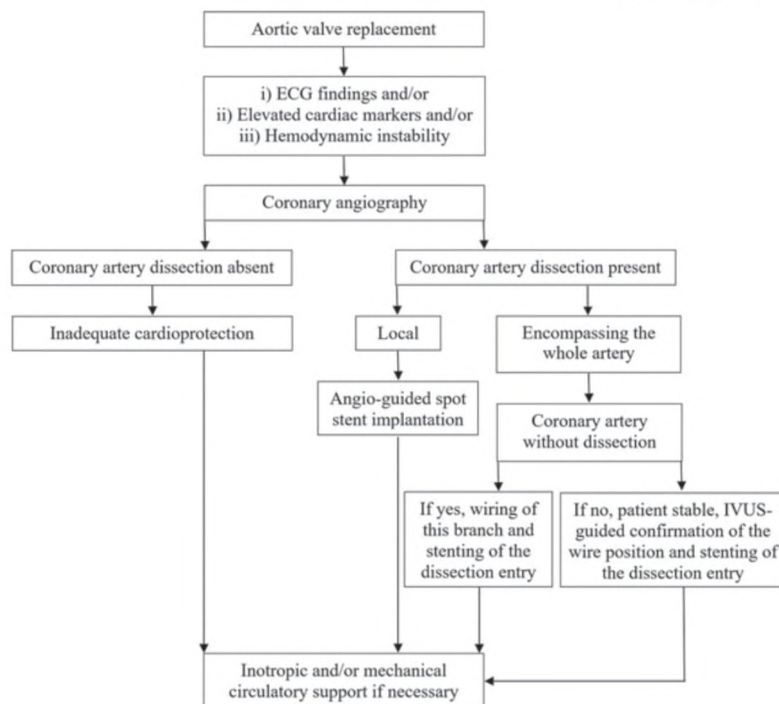
**FIGURE 1** The angiography of the presented cases. First patient. A,B, Dissection beginning in the LM, passing through the LAD, with occlusion of the proximal LCx, and occlusion of the Dgl. C,D, After the wiring blood flow restored in the left coronary system. E, The guidewire in the Dgl. F, A stent implanted in the LM on the wire in the Dgl. G,H, Final result with closed the entry of dissection and good epicardial flow despite the persistent distal dissection. Second patient. I, LM dissection involving LAD. J, Following catheter insertion, the dissection stabilized and was not at all visible. K, Following LAD wiring an IVUS confirmed the position of the wire in the true lumen. L, Final result after the stent implantation from the LM to LAD with full epicardial flow. Third patient. M, A normal left coronary system. N, Ostial RCA occlusion. O, In the next contrast injection a local dissection in the proximal RCA. P, A stent successfully implanted

distal dissection in the whole of the left system (Figure 1G and 1H). After a 2-week period the patient was discharged and now has completed a 2-year follow-up.

The second patient is a 56-year-old male with symptomatic, severe AS and a moderate aortic insufficiency. According to the EUROSCORE II (1.29%) and STS (0.95%), the risk of surgery was deemed to be low. He underwent AVR with a Sorin Crown of phospholipid reduction treatment (PRT) (LivaNova PLC) 23 mm, using the ministernotomy approach with CPB and hypothermia. The following day after surgery, highly elevated cardiac enzymes (troponin T was 3.26 ng/mL) were detected with a new left bundle branch block (LBBB). In the coronary angiography, we found an LM dissection involving LAD (Figure 1I). Following catheter insertion into the ostium of the LM, the dissection stabilized and was not at all visible (Figure 1J). Therefore, following LAD wiring an IVUS was used to confirm the position of the wire in the true

lumen, with blood flow between the media and the intima (Figure 1K). Immediately after the stent implantation from the LM to LAD full epicardial flow was restored (Figure 1L), however, 2 hours later the patient suffered a fatal cardiac arrest.

The third patient is an 85-year-old female with a mixed rheumatic aortic valve disease. The assessed risk of surgery, according to the EUROSCORE II (2.32%) and STS (3.05%), was deemed to be moderate. She underwent AVR Sorin Crown PRT 19 mm using ministernotomy. Immediately after the operation, she had elevated cardiac markers (troponin T was 2.96 ng/mL) and required three catecholamine infusions. Coronary angiography was to reveal a normal left coronary system (Figure 1M) and ostial right coronary artery (RCA) occlusion (Figure 1N). The subsequent contrast injection showed a local dissection in the proximal RCA, with an irregular and narrow true lumen (Figure 1O). Following gentle wiring and balloon predilation, a



**FIGURE 2** The proposal of the diagnostic and therapeutic algorithm in case of the dissected coronary artery. ECG, electrocardiography; IVUS, intravascular ultrasound

stent was successfully implanted (Figure 1P). On the second day following surgery, she died as a result of right ventricular failure.

### 3 | DISCUSSION

In the current study, all the patients examined suffered from symptoms of low cardiac output syndrome following periprocedural MI with highly elevated cardiac necrotic enzymes within the first day after AVR. Before this happened, while in the operating theater and subsequently in the first hours following surgery they were hemodynamically stable without any ischemic changes in the electrocardiography (ECG). In the differential diagnosis, we are aware of the risk of inadequate cardioprotection or coronary artery injury due to its mechanical cannulation despite the lack of coronary lesions in the ostial and proximal segments of coronary arteries in the angiography performed before surgery. For that reason, we performed coronary angiography. There are no guidelines or recommendations on the procedure given such a clinical setting. In cases of intact coronary ostia in angiography, a patient remains on inotropic and/or mechanical circulatory support. In turn, in the case of coronary dissection considered should also be revascularization.

In a patient suffering from MI after AVR following iatrogenic coronary artery dissection as a result of its cannulation for

selective cardioplegia administration, the proposal as to how to identify the true lumen depends entirely on the type of dissection (Figure 2).<sup>4,5</sup> In the case of local dissection simple angiography assessment should be enough, whereas in a dissection encompassing the whole of the coronary tree it is necessary to either find the coronary artery not involved in the dissection or to confirm the position of the guidewire by means of IVUS imaging or optical coherence tomography.

Coronary dissection following AVR could be treated by using either percutaneous coronary intervention (PCI) or coronary artery bypass surgery (CABG). In most cases, stenting of the dissection entry is sufficient to restore the proper blood flow. In the case of distal propagation of the dissection, multiple stenting is necessary. The alternative treatment option is CABG. The main concerns of the CABG procedure in a patient with coronary dissection are associated with patient hemodynamic instability, with performing an effective distal anastomosis of the graft with dissected coronary artery and with the risk of a subsequent CPB straight after AVR. Our patients, following consultation with cardiac surgeons, were treated with PCI as a result of their hemodynamic instability. However, our results confirm that revascularization in such cases is associated with a high risk of death due to the extremely large reperfusion injury, therefore, the

use of mechanical short-term circulatory support seems to be a reasonable option but one that requires prior preparation.<sup>6,7</sup>

#### 4 | CONCLUSIONS

From our perspective, the optimal management in patients with MI following AVR should include prompt diagnosis and in the case of coronary artery dissection, the immediate identification of the true lumen with immediate stenting or CABG followed by further inotropic and/or mechanical circulatory support as necessary.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Joanna Ajdukiewicz and Jakub Latka for their invaluable technical support. This study was supported by grants of the Jagiellonian University Medical College (K/ZDS/006441) and National Science Centre Poland (2016/21/B/NZ5/01378) for JZ.

#### CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: JZ. Data collection: PM and JZ. Data interpretation: PM, JN, and JZ. Drafting article: PM. Critical revision of the article: PM, JN, and JZ.

#### ORCID

Patrycja Molek  <http://orcid.org/0000-0001-9920-1256>

Jaroslav Zalewski  <http://orcid.org/0000-0002-4374-3694>

#### REFERENCES

1. Brown ML, McKellar SH, Sundt TM, Schaff HV. Ministernotomy versus conventional sternotomy for aortic valve replacement: a systematic review and meta-analysis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;137:670-679.
2. Nakao K, Sawai T, Nakahira J, Hamakawa A, Ishii H, Minami T. Left main coronary artery dissection during aortic valve replacement. *Anesth Analg.* 2017;124:1789-1791.
3. Kyavar M, Bassiri H, Sadeghpour A, Alizadehasl A, Pouraliakbar H, Kargar F. Left main coronary artery dissection after valve replacement. Role of coronary computed tomographic angiography. *Tex Heart Inst J.* 2012;39:770-771.
4. Saw J, Mancini GBJ, Humphries K, et al. Angiographic appearance of spontaneous coronary artery dissection with intramural hematoma proven on intracoronary imaging. *Cathet Cardiovasc Intervent.* 2016;87: E54-E61.
5. Maehara A, Mintz GS, Castagna MT, et al. Intravascular ultrasound assessment of spontaneous coronary artery dissection. *Am J Cardiol.* 2002;89:466-468.
6. Chiu P, Fearon WF, Raleigh LA, et al. Salvage extracorporeal membrane oxygenation prior to "Bridge" transcatheter aortic valve replacement. *J Card Surg.* 2016;31:403-405.
7. Ishino K, Murakami T, Teramoto S. Cannulation-induced coronary artery dissection: successful management with circulatory assist devices and coronary bypass grafting. *Surg Today.* 1998;28: 563-566.

How to cite this article: Molek P, Nessler J, Zalewski J. Coronary artery dissection following aortic valve replacement. How can one deal with this rare yet life-threatening complication? *J Card Surg.* 2019; 1-4. <https://doi.org/10.1111/jocs.13995>

## 6. Materiał i metody

### 6.1. Charakterystyka badanych grup, kryteria włączenia, wyłączenia

#### 6.1.1. Publikacja 1

Do badania włączono 70 pacjentów z ostrym MI z uniesieniem odcinka ST (STEMI, ang. *ST elevation myocardial infarction*) leczonym metodą pierwotnej angioplastyki wieńcowej (pPCI, ang. *primary percutaneous coronary intervention*). Do badania byli włączani pacjenci ze STEMI wiążącym się z możliwością wystąpienia dużej strefy uszkodzenia miokardium, często z zawałem ściany przedniej. Wyjściowo, przy przyjęciu oraz po 6 miesiącach obserwacji pacjentom pobierano krew, aby zmierzyć poziom osoczowego stężenia argininy, ornityny, cytruliny, proliny, ADMA oraz azotanów i azotynów (NO<sub>x</sub>, ang. *nitrite/nitrate*) metodą chromatograficzną. Wyniki oznaczeń z krwi zestawiono z ocenionymi w rezonansie magnetycznym serca (CMR, ang. *cardiac magnetic resonance*) funkcją lewej komory, jej objętością i masą oraz parametrami charakteryzującymi jej uszkodzenie, w tym strefą zagrożenia martwicą (AAR, ang. *area at risk*), strefą zawału (IS, ang. *infarct size*) i strefą obstrukcji mikrokrążenia (MVO, ang. *microvascular obstruction*, MVO) a ponadto ze zdarzeniami klinicznymi podczas 5-letniego okresu obserwacji takim jak zgon, ponowny MI lub hospitalizacja z powodu niewydolności serca.

#### 6.1.2. Publikacja 2

Włączono 100 pacjentów ze STEMI leczonym metodą pPCI. U wszystkich pacjentów zmierzono poziom argininy, ornityny, cytruliny, proliny, sperminy, spermidyny, putrescyny, agmatyny, ADMA oraz monometyloargininę (MMA, ang. *N-monomethyl-L-arginine*) metodą chromatograficzną przy przyjęciu oraz po 6 miesiącach. Próbę kontrolną stanowiło 25 pacjentów z przewlekłym zespołem wieńcowym dobranych pod względem demografii, czynników ryzyka sercowo-naczyniowego i chorób towarzyszących, u których nie stwierdzono zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych pomimo dodatnich wyników wykonanych wcześniej badań obciążeniowych takich jak próba wysiłkowa,

echokardiograficzny test dobutaminowy czy scyntygrafia perfuzyjna mięśnia sercowego. Wyniki oznaczeń z krwi zestawiono z budową ściany tętnicy dozawałowej (IRA, ang. *infarct-related artery*) zobrazowanej przy użyciu optycznej koherentnej tomografii (OCT, ang. *optical coherence tomography*) ze szczególnym uwzględnieniem budowy zmiany odpowiedzialnej za MI, a także struktury 10-milimetrowego segmentu przylegającego do zmiany odpowiedzialnej za MI proksymalnie i dystalnie. W ciągu pierwszych 5 dni po MI oceniono funkcję serca za pomocą badania echokardiograficznego. Przeprowadzono także odległą obserwację kliniczną pacjentów, w której oceniano wystąpienie zdarzeń sercowo-naczyniowych takich jak zgon, ponowny MI, nieplanowa rewaskularyzacja z powodu objawów niedokrwienia lub udar.

**Kryteria włączenia i wyłączenia dla Publikacji 1 i 2 w znacznej mierze pokrywały się.**

**Kryteria włączenia:** ból spoczynkowy w klatce piersiowej trwający nie dłużej niż 12 godzin z towarzyszącym uniesieniem odcinka ST >1 mm w 2 lub więcej przylegających odprowadzeniach kończynowych lub >2 mm w co najmniej 2 odprowadzeniach przedsercowych lub nowy blok lewej odnogi pęczka Hissa (ang. *left bundle branch block*, LBBB).

**Kryteria wyłączenia:** brak zgody pacjenta na udział w badaniu, wstrząs kardiogeny, obrzęk płuc, wywiad MI lub PCI tego samego obszaru miokardium, przebyte pomostowanie aortalno-wieńcowe (CABG, ang. *coronary artery bypass grafting*), wywiad choroby nowotworowej, choroba zakrzepowo-zatorowa, niewydolność nerek lub wątroby. Ponadto w pierwszej publikacji dodatkowym kryterium wyłączenia były przeciwwskazania do wykonania CMR, a w drugiej publikacji przeciwwskazania do wykonania OCT.

### 6.1.3. Publikacja 3

Publikacja 3 stanowi opis trzech pacjentów, u których po operacji wymiany zastawki aortalnej doszło do MI związanego z przeprowadzoną procedurą chirurgiczną. U każdego z opisanych pacjentów śródoperacyjnie, po kaniulacji tętnic wieńcowych w celu podania kardiopleginy do zapewnienia odpowiedniej karidoprotekcji doszło do bardzo rzadkiego powikłania polegającego na mechanicznym rozwarstwieniu ujścia tętnicy wieńcowej, a w efekcie końcowym do MI związanego z procedurą. Czasopismo, w którym anonimowe dane pacjentów zostały opublikowane, nie wymagało zgody komisji bioetycznej.

## 6.2. Zastosowane metody diagnostyczne

### Rezonans magnetyczny serca

Obrazowanie CMR wykonano przy użyciu aparatu 1.5-Tesla Magnetom Sonata Maestro Class (Siemens, Erlangen, Germany). Pierwsze badanie wykonano pomiędzy 2. a 4. dniem po pPCI, drugie po 6 miesiącach [45].

Stosując bramkowania EKG, na wydechu oceniano funkcję lewej komory (LV, ang. *left ventricle*) w sekwencji *cine*. Po sekwencjach *cine* oceniono obrzęk miokardium odzwierciedlający AAR w sekwencji T2-zależnej. Następnie wykonano obrazowanie z zastosowaniem wzmocnienia kontrastowego gadobutrolem w dawce 0,1 mmol/kg (Gadovist, Bayer Pharma AG, Niemcy). Akwizycję wykonywano pomiędzy 10. a 20. minutą po podaniu kontrastu w celu oceny IS i MVO. Całą objętość lewej komory pokryto kolejnymi, przylegającymi do siebie 8-milimetrowej grubości plastrami, ułożonymi prostopadle do osi długiej LV.

Analizę uzyskanych obrazów przeprowadzono przy pomocy oprogramowania Cardioviewer (KU Leuven, Belgium) w sposób zaślepiony. Granice wsierdzia i nasierdzia obrysowano w fazie największej i najmniejszej objętości LV, aby określić odpowiednio objętość końcowo-rozkurczową i końcowo-skurczową LV. Na podstawie pomiarów objętości

LV obliczano jej frakcję wyrzutową, a po przemnożeniu przez gęstość tkanki 1,05 g/ml jej masę. Obrzęk mięśnia sercowego obrysowano na obrazach T2-zależnych, a IS i MVO po wzmocnieniu kontrastowym. Obrysowana powierzchnia AAR, IS i MVO w każdym plastrze pomnożona przez jego grubość i przez gęstość tkanki mięśnia sercowego (1,05 g/ml) pozwoliła obliczyć masę odpowiednio AAR, IS i MVO. AAR wyrażono jako proporcję masy LV. Z kolei hiperdensyjny obszar IS odniesiono do obrzęku mięśnia sercowego (IS/AAR) lub masy LV (IS/LV), a MVO wyrażono jako wskaźnik obszaru zawału (MVO/IS).

### **Optyczna koherentna tomografia**

Obrazowanie metodą OCT zostało wykonane przy pomocy systemu Lunawave OFDI firmy Terumo (Tokyo, Japan). Po udrożnieniu IRA cewnik do OCT został wprowadzony dystalnie do miejsca zmiany odpowiedzialnej za MI. Podczas skanowania ściany tętnicy jej światło zostało wypełnione słupem kontrastu podawanego dowieńcowo z szybkością 4 ml/sek. Procedura była powtórzona po wszczępieniu stentu. Wszystkie obrazy zapisane cyfrowo zostały poddane analizie przez niezależnego badacza zaślepionego w stosunku do pozostałych informacji klinicznych i laboratoryjnych, oddzielnie dla zmiany odpowiedzialnej za MI oraz w zakresie segmentów przylegających do niej 10 mm proksymalnie i 10 mm dystalnie. W obrębie zmiany odpowiedzialnej za MI na każdym poprzecznym skanie oceniono morfologię ściany tętnicy, w tym cechy niestabilności blaszki miażdżycowej takie jak cienka włóknista czapeczka (TCFA, ang. *thin-cap fibroatheroma*), jej pęknięcie, obecność martwiczego rdzenia, nacieku makrofagów, vasa vasorum lub krwiaka śródściennego. Na przekroju podłużnym została zmierzona długość zmiany odpowiedzialnej za MI. Na kolejnych przekrojach poprzecznych obrysowano pole naczynia, jego światło i pole zakrzepu. Ładunek zmiany i zakrzepu został obliczony ze wzoru: średnie pole zmiany/zakrzepu  $\times$  długość zmiany/zakrzepu [46]. Przyczynę niedrożności IRA



zdefiniowano jako: erozję lub pęknięcie blaszki miażdżycowej, dyssekcję lub ciasne zwężenie, natomiast dominujący komponent zmiany odpowiedzialnej za MI oceniono jako zakrzepowy, lipidowy, włóknisty lub zwapnienie. Półilościowo rozmiar ładunku lipidowego w obrębie zmiany wyrażono jako długość rdzenia lipidowego o łuku >90 stopni, natomiast stopień uwapnienia jako maksymalny łuk, jego długość i maksymalną grubość.

W segmencie poza zmianą odpowiedzialną za MI obrysowano światło naczynia oraz granicę warstwy wewnętrznej (intima) i warstwy środkowej (media) na najbardziej proksymalnym przekroju, na najbardziej dostępnym dystalnym przekroju, na trzech przekrojach w obrębie 10 mm przylegających proksymalnie do zmiany odpowiedzialnej za zawał (10 mm przed, 5 mm przed i na granicy zmiany) oraz na trzech przekrojach w obrębie 10 mm przylegających dystalnie do zmiany odpowiedzialnej za zawał (10 mm za, 5 mm za i na granicy zmiany). Uzyskane obrysy posłużyły do obliczenia powierzchni błony wewnętrznej, warstwy środkowej, kompleksu intima-media i światła tętnicy. Na tych samych przekrojach, na podstawie pomiarów wykonanych co 90 stopni, obliczano średnie grubości intymy, medii, kompleksu intima-media i światła. Średnie wartości dla regionu przylegającego do zmiany odpowiedzialnej za zawał były uzyskane ze wszystkich pomiarów z 10-milimetrowego segmentu proksymalnego lub dystalnego. Na analizowanych przekrojach określono dominujący typ histologiczny blaszki jako lipidowy, włóknisty, zwapnienie, pogrubioną intymę lub jako normalną ścianę.

### **Chromatografia cieczowa**

Próbki krwi pobierano na cytrynian przy przyjęciu do szpitala w ostrej fazie MI i ponownie 6 miesięcy później. Krew odwirowywano w 2500 g, w temperaturze od 18 do 22°C przez 20 minut i przetwarzano natychmiast lub przechowywano w temperaturze -80°C do czasu analizy. Białka osocza wykorzystywane do analizy aminokwasów były wytrącane

przed pomiarem za pomocą 80% metanolu. Stężenia argininy, ornityny, cytruliny, proliny, sperminy, spermidyny, putrescyny, agmatyny, azotanów/azotynów (NO<sub>x</sub>), ADMA i MMA mierzono w dwóch powtórzeniach za pomocą ultraszybkiej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią masową (ang. *ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, UPLC-MS/MS) z użyciem aparatu Waters ACQUITY UPLC (Waters Corporation, Milford, MA, USA) sprzężonego ze spektrometrem mas Waters TQD (tryb jonizacji elektrospray ESI-tandem quadropole). Procedurę pomiaru NO<sub>x</sub> przeprowadzono dwiema metodami [47]. W przypadku azotynów procedura obejmowała bezpośrednią derywatyzację do związku azowego-4-((4-((2-aminoetylo)amino)naftalen-1-yl)diazenyl)benzenosulfonamidu, który następnie był oznaczany ilościowo z wykorzystaniem tandemowej spektrometrii masowej UPLC-MS/MS. Procedura dla azotanów obejmowała dwa etapy: enzymatycznej redukcji do azotynów, a następnie derywatyzację do związków azowych i pomiar ilościowy, jak opisano powyżej. Pomiary w próbkach osocza były wykonywane równolegle, a ostateczna zawartość azotanów była obliczana na podstawie różnicy pomiędzy wartościami uzyskanymi z obu procedur, ponieważ druga z metod jednocześnie oznaczała ilościowo azotyny i azotany w próbce.

Rozdziały chromatograficzne przeprowadzono z wykorzystaniem kolumny Acquity UPLC BEH C18, 2,1×100 mm, o wielkości cząstek 1,7 μm, wyposażonej w prekolumnę Acquity UPLC BEH C18 VanGuard. Kolumnę utrzymywano w temperaturze 40°C i eluowano w następujących warunkach: elucja liniowym gradientem od 100 do 20% eluentu A przez 4 minuty, następnie elucja izokratyczna 20% eluentu A przez 2 minuty oraz elucja liniowym gradientem od 20 do 100% eluentu A przez 1 minutę przy przepływie 0,3 mL/min (0,3 mL/min). 0,3 mL/min (Eluent A: woda/kwas mrówkowy (0,1%, v/v); eluent B: acetonitryl/kwas mrówkowy (0,1%, v/v). 10 μL każdej próbki wstrzykiwano w trzech powtórzeniach.

Rozdziały chromatograficzne aminokwasów prowadzono z wykorzystaniem kolumny Acquity UPLC BEH Amide o wymiarach  $2,1 \times 100$  mm i wielkości cząstek  $1,7 \mu\text{m}$  wyposażonej w prekolumnę VanGuard Acquity UPLC BEH Amide.

Kolumnę utrzymywano w temperaturze  $40^\circ\text{C}$  i eluowano w warunkach liniowego gradientu elucji od 20% do 35% eluentu A w ciągu 4 minut, a następnie liniowego gradientu elucji od 35% do 40% eluentu A w ciągu 6 minut, z szybkością przepływu  $0,3 \text{ mL/min}$ . (Eluent A: woda/kwas mrówkowy (0,1%, v/v); eluent B: acetonitryl/kwas mrówkowy (0,1%, v/v)). Parametry spektrometru masowego Waters TQD zoptymalizowano do analizy ilościowej, stosując roztwory L-argininy, NG, NG-dimetyloargininy, L-cytruliny, L-ornityny, L-proliny, 4-((4-((2-aminoetylo)amino)naftalen-1-yl)diazenyl)benzenesulfonamidu i chloramfenikolu, o stężeniu  $10 \mu\text{g/mL}$  przy przepływie  $20 \mu\text{L/min}$  oraz mieszaninę eluentów A i B 1:1 (v/v) przy prędkości przepływu  $0,28 \text{ mL/min}$ .

Wskaźnik biodostępności argininy (ang. *global arginine bioavailability ratio*, GABR) obliczono jako stosunek stężenia argininy do sumy stężeń ornityny i cytruliny.

### 6.3. Statystyka

Analizy statystyczne zostały wykonane z pomocą programu SPSS Statistics software (wersja 25.0.0.2, IBM, USA). Zmienne ciągłe zostały wyrażone jako mediany (rozstęp międzykwartyłowy), a zmienne kategoriyczne jako liczby (procenty). Zmienne ciągłe były najpierw ocenione pod kątem rozkładu przy użyciu testu Shapiro-Wilk oraz porównane testem t-Studenta gdy rozkład był normalny lub testem U Mann-Whitney gdy rozkład był pozanormalny. Zmienne zależne zarówno dla rozkładu normalnego i pozanormalnego były porównane odpowiednio testem t-studenta dla prób zależnych lub testem rang Wilcoxon. Zmienne kategoriyczne były porównywane przy użyciu dokładnego testu Fishera. Zależności między dwiema ciągłymi zmiennymi oceniano, stosując odpowiednio korelacje rang Spearmana dla zmiennych o rozkładzie pozanormalnym lub Pearsona, gdy rozkład był

normalny. Arginina, jej metabolity i pochodne zostały ocenione pod kątem przewidywania obecności TCFA w obrębie zmiany odpowiedzialnej za zawał, jak również pod kątem wystąpienia złożonego klinicznego punktu końcowego w analizie krzywych metodą ROC (ang. *receiver operating characteristic*). Sprawdzono, czy arginina, jej metabolity lub jej pochodne wiążą się w sposób niezależny z obecnością TCFA (regresja logistyczna), grubością kompleksu intima-media segmentu przylegającego do zmiany odpowiedzialnej za zawał (regresja liniowa) oraz klinicznym złożonym punktem końcowym (regresja Coxa). Dwustronne  $P < 0.05$  uznano za istotne statystycznie.

## 7. Podsumowanie wyników

### 7.1. Publikacja 1

#### *Struktura, funkcja i uszkodzenie lewej komory*

Nie stwierdzono istotnych różnic w objętości LV w późnym skurczu (LVESV, ang. *left venticle end-systolic volume*) i późnym rozkurczu (LVEDV, ang. *left venticle end-diastolic volume*) oraz we frakcji wyrzutowej LV (ang. *left ventricular ejection fraction*, LVEF) pomiędzy wartościami wyjściowymi i po 6 miesiącach. Po 6 miesiącach wzrosła objętość wyrzutowa ( $P=0,005$ ), a zmniejszyła się masa LV ( $P=0,011$ ).

Mediana AAR wynosiła 51% objętości LV. Wskaźnik IS/LV zmniejszył się z 0,34 wyjściowo do 0,21 w okresie obserwacji ( $P<0,001$ ). MVO uwidocznił u 54 z 70 pacjentów, a jego mediana wyniosła 8% strefy zawału.

#### *Arginina i jej metabolity*

Stężenie argininy wyjściowo było wyższe o 49% ( $P=0,002$ ), ADMA o 42% ( $P=0,032$ ) oraz NOx o 28% ( $P<0,001$ ) w porównaniu do stężeń po 6 miesiącach. Nie stwierdzono istotnych różnic w odniesieniu do stężenia ornityny, cytruliny oraz proliny pomiędzy badanymi punktami czasowymi. Zaobserwowano istotne wzajemne korelacje pomiędzy stężeniami argininy, ornityny oraz cytruliny zarówno w ostrej fazie jak i po 6 miesiącach. Korelacje pomiędzy stężeniami NOx oraz argininy, ornityny i cytruliny zaobserwowano jedynie w fazie stabilnej. Nie obserwowano istotnych różnic w obu punktach czasowych w zakresie indeksów cytrulina/ornityna oraz arginina/ADMA, podczas gdy wskaźnik cytrulina/arginina był niższy w okresie ostrej fazy ( $P=0,002$ ) w porównaniu do obserwacji odległej.

### *Metabolity argininy i jej pochodne a uszkodzenie mięśnia sercowego w ostrej fazie MI*

Poziomy stężenie metabolitów argininy mierzone w okresie ostrej fazy MI nie były skorelowane z zindeksowanymi objętościami LV, masą LV oraz LVEF ocenionymi w CMR 2-4 dni po pPCI, z wyjątkiem argininy i zindeksowanej LVEDV.

Odnotowano istotne korelacje pomiędzy stężeniem argininy, cytruliny, ornityny i ADMA oraz współczynnikiem AAR/LV oraz IS/LV. Stężenia argininy (62,8 [49,6-81,8] versus 29,1 [16,8-76,4]  $\mu\text{M}$ ,  $P=0,021$ ) oraz ADMA (2,11 [1,76-2,57] versus 0,74 [0,51-2,13]  $\mu\text{M}$ ,  $P=0,009$ ) były wyższe, a stężenie NOx (7,7 [5,7-9,6] versus 11,4 [8,4-13,4]  $\mu\text{M}$ ,  $P=0,003$ ) było niższe u chorych z MVO w porównaniu do tych bez.

Wskaźnik NOx/arginina korelował odwrotnie proporcjonalnie z wartościami indeksów AAR/LV oraz IS/LV oraz zindeksowanymi LVEDV i LVESV. Chorzy z MVO charakteryzowali się niższymi wartościami NOx/arginina w porównaniu z pacjentami bez MVO (0,13 [0,08-0,22] versus 0,36 [0,11-0,61],  $P=0,022$ ). Wartość indeksu NOx/ADMA w trakcie ostrej fazy korelowała odwrotnie proporcjonalnie z AAR/LV, IS/LV oraz zindeksowanymi LVEDV i LVESV. U chorych z MVO obserwowano niższy poziom wskaźnika NOx/ADMA w stosunku do pozostałych pacjentów (3,91 [2,28-6,34] versus 12,90 [3,19-20,84],  $P=0,007$ ).

### *Metabolity argininy i ich wskaźniki a uszkodzenie mięśnia sercowego w fazie przewlekłej*

Po 6 miesiącach jedynie prolina korelowała z zindeksowanymi LVEDV i LVESV oraz z masą LV. Odnotowano odwrotną korelację pomiędzy wskaźnikiem cytrulina/ornityna a masą LV i zindeksowanymi objętościami LV oraz korelację prostą z LVEF.

### *Obserwacja odległa*

Wszyscy chorzy ukończyli roczny i 5-letni okres obserwacji. Nie obserwowano różnicy w poziomie argininy w okresie ostrej fazy MI pomiędzy chorymi, u których wystąpił

złożony punkt końcowy w stosunku do pozostałych (57,5 [24,1-70,8] versus 63,7 [41,1-81,82],  $P = 0,53$ ). Stężenia argininy po 6 miesiącach osiągnęło wartość 0,67 dla pola pod krzywą ROC (95% przedział ufności 0,54–0,81,  $P=0,025$ ) dla przewidywania zgonu, ponownego MI lub hospitalizacji z powodu niewydolności serca z czułością 66% oraz swoistością 65%. Punkt odcięcia  $< 29 \mu\text{M}$  dla powyższego oznaczenia związany był z mniejszym przeżyciem wolnym od zdarzeń klinicznych ( $P=0,02$ ). Analiza wieloczynnikowa metodą regresji Coxa wykazała, że stężenie argininy  $< 29 \mu\text{M}$  zmierzone po 6 miesiącach od zawału z poprawką na wiek, płeć oraz IS było niezależnie związane z ponad 2,5-krotnie częstszym występowaniem złożonego punktu końcowego.

## 7.2. Publikacja 2

### *Metabolity argininy i jej wskaźniki*

W ostrej fazie MI w porównaniu do pomiarów z fazy przewlekłej odnotowano wyższe stężenie ornityny o 73% oraz proliny o 76%, i jednocześnie niższe wartości poziomu argininy o 41%, ADMA o 40% oraz cytruliny o 71% ( $P<0,001$  dla wszystkich wartości). U chorych z grupy kontrolnej obserwowano niższe wartości ornityny ( $P<0,001$ ), proliny ( $P=0,004$ ) oraz ADMA ( $P=0,006$ ) bez istotnych różnic w zakresie wartości argininy ( $P=0,35$ ) oraz cytruliny ( $P=0,61$ ) aniżeli u pacjentów z MI w stabilnej fazie.

W ostrej fazie MI wskaźniki cytrulina/arginina, cytrulina/ornityna oraz GABR były niższe, podczas gdy wskaźniki ornityna/arginina oraz prolina/arginina były wyższe w stosunku do pomiarów z fazy przewlekłej ( $P<0,001$  dla wszystkich wartości). U chorych z grupy kontrolnej obserwowano niższe wartości wskaźników ornityna/arginina ( $P=0,016$ ) oraz prolina/arginina ( $P=0,017$ ), a także wyższe wartości indeksu cytrulina/ornityna ( $P=0,002$ ) w porównaniu do pacjentów z MI w fazie stabilnej.

### *Metabolity argininy a TCFA*

W ostrej fazie zawału choroby z TCFA obecna w zmianie odpowiedzialnej za zawał mieli wyższe stężenie ADMA (P=0,015) i ornityny (P=0,003) bez istotnych zmian w odniesieniu do argininy, cytruliny oraz proliny w porównaniu do pacjentów bez TCFA. Wśród chorych z TCFA stwierdzono niższe wartości indeksów cytrulina/ornityna (P=0,003) oraz arginina/ADMA (P=0,040) oraz wyższe wartości wskaźnika ornityna/arginina (P=0,045) w porównaniu do pozostałych.

### *Metabolizm argininy a błona wewnętrzna IRA*

Średnia grubość błony wewnętrznej lub kompleksu intima-media w przylegającym do zmiany odpowiedzialnej za MI, 10-milimetrowym segmencie proksymalnym i dystalnym była większa u mężczyzn, a po 6 miesiącach korelowała pozytywnie ze wskaźnikiem ornityna/arginina i odwrotnie ze stężeniem argininy, GABR i wskaźnikiem cytrulina/ornityna. Średnia grubość błony wewnętrznej lub kompleksu intima-media dystalnej referencji korelowała z 6-miesięcznym wskaźnikiem ornityna/arginina, a odwrotnie proporcjonalnie ze stężeniami argininy, proliny, cytruliny oraz ze wskaźnikami cytrulina/ornityna i prolina/arginina. Średnia grubość medii w dystalnym segmencie IRA korelowała odwrotnie proporcjonalnie z wartościami argininy, cytruliny, proliny i wskaźnikiem cytrulina/ornityna mierzonymi w trakcie 6-miesięcznego okresu obserwacji. Im bardziej dystalny segment analizowano, tym silniejsze były korelacje pomiędzy średnią grubością intymy, kompleksu intima-media i medii a metabolitami argininy oraz ich wskaźnikami.



### *Niezależne czynniki ryzyka obecności TCFA oraz grubości kompleksu intima-media*

Analiza wieloczynnikowa metodą regresji logistycznej pokazała, że wyższe stężenie kreatyniny ( $P=0,032$ ) oraz niższa wartość wskaźnika cytrulina/ornityna ( $P=0,006$ ) w ostrej fazie MI były związane z częstszą obecnością TCFA. Wskaźnik cytrulina/ornityna osiągnął wartość 0,77 dla pola pod krzywą ROC (95% przedział ufności 0,66-0,88) dla przewidywania obecności TCFA z punktem odcięcia  $\geq 0,12$  oraz czułością 89,0% i swoistością 57,1%.

Z kolei wieloczynnikowa analiza liniowa wskazała płęć męską ( $P<0,001$ ), cukrzycę ( $P=0,024$ ) oraz wyższe wartości wskaźnika ornityna/arginina ocenione w fazie przewlekłej ( $P=0,018$ ) jako niezależnie powiązane z większą grubością kompleksu intima-media w przylegającym do zmiany odpowiedzialnej za MI segmencie IRA.

### *Obserwacja odległa*

Spośród 100 włączonych pacjentów w czasie obserwacji o medianie 16 (16-30) miesięcy 4 pacjentów zmarło, w tym 2 przed wypisem ze szpitala, u 4 wystąpił powtórny MI, udar u 3, a pilna angioplastyka z powodu dławicy niestabilnej była wykonana u 3 chorych. Złożony punkt końcowy wystąpił u 14 pacjentów i u tych pacjentów obliczony 6 miesięcy po MI wskaźnik ornityna/arginina był wyższy, a GABR był niższy niż u pozostałych. Wskaźnik ornityna/arginina oznaczony po 6 miesiącach osiągnął pole pod krzywą ROC 0,80 (95% przedział ufności 0,68-0,91) dla przewidywania wystąpienia zgonu, zawału, udaru lub nieplanowej PCI z powodu dławicy niestabilnej z punktem odcięcia  $\geq 0,57$ , czułością 74,1% i swoistością 78,0%

### **7.3. Publikacja 3**

W publikacji opisano trzech chorych leczonych z powodu ciężkiego zwężenia lewego ujścia tętniczego. W trakcie chirurgicznej wymiany zastawki aortalnej dowieńcowo podano kardioplegine jako element standardowej procedury. W pierwszych godzinach po operacji u

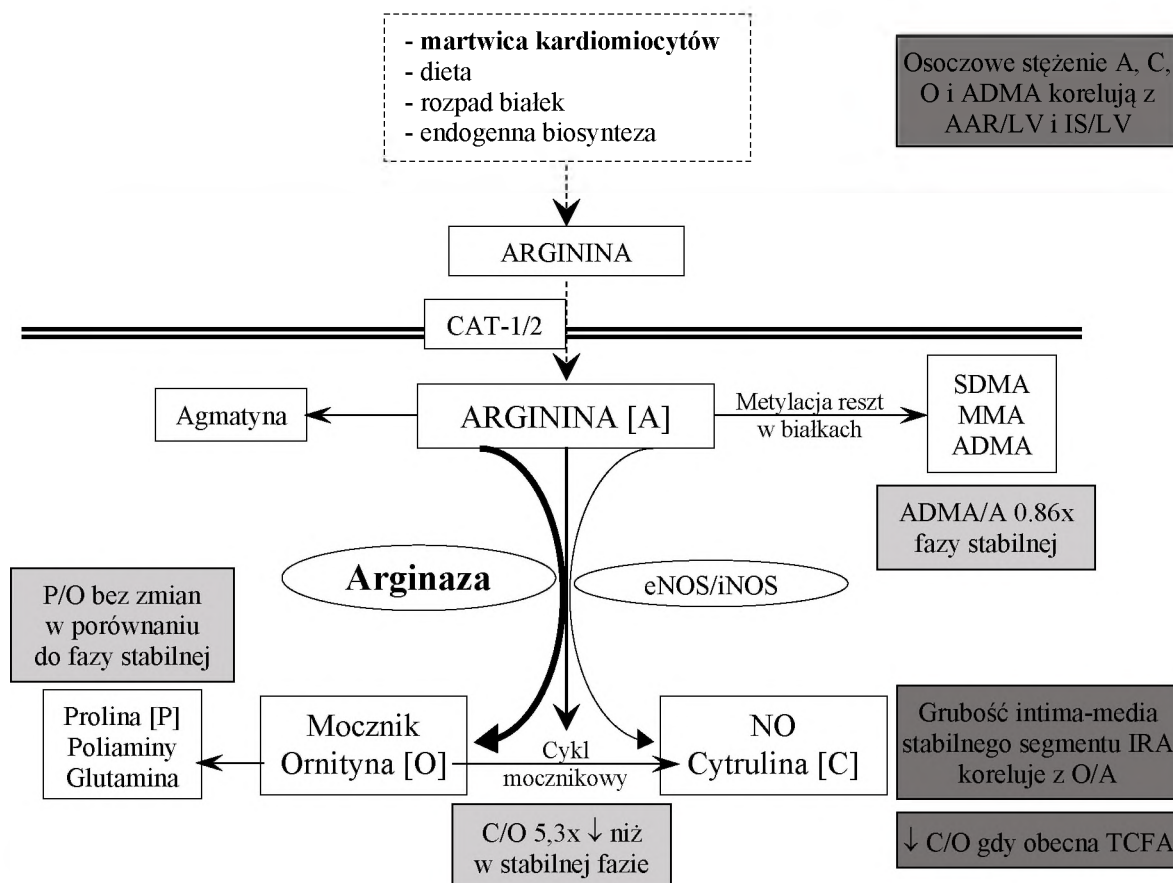
każdego z pacjentów odnotowano podwyższony poziom enzymów wskaźnikowych martwicy miokardium, któremu towarzyszyły zmiany w EKG i/lub zaburzenia hemodynamiczne. Z tego powodu u wszystkich chorych wykonano kontrolną koronarografię, uwidaczniając w dwóch przypadkach dyssekcję pnia głównego, a u trzeciego chorego rozwarstwianie prawej tętnicy wieńcowej. U wszystkich pacjentów ujścia rozwarstwionych naczyń zostały zastentowane, w przypadku tego wymagającym pod kontrolą wewnątrzwieńcowej ultrasonografii dopplerowskiej (IVUS, ang. *intravascular ultrasound*). Niestety dwaj pacjenci zginęli na fali reperfuzji, trzeci zakończył 2-letnią obserwację. Opis trzech przypadków rzadkiego powikłania posłużył do opracowania propozycji postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w przypadku objawów ostrego niedokrwienia po operacji chirurgicznej wymiany zastawki aortalnej.

## 8. Dyskusja i wnioski

Artykuły składające się na niniejszą rozprawę doktorską przedstawiają wyniki dwóch, prospektywnych badań oceniających zmiany stężenia argininy i jej metabolitów w ostrej fazie zawału i stabilnym okresie pozawałowym oraz ich związek z uszkodzeniem miokardium i nasileniem zmian w nasierdziowych tętnicach wieńcowych. Trzecia praca to opis trzech przypadków rzadkiego powikłania operacji zastawki aortalnej zakończonego zawałem okołoperacyjnym. Wyniki każdej z prac zostały szczegółowo przedyskutowane w poszczególnych artykułach, a w poniższej dyskusji przedstawiono podsumowanie zawierające najistotniejsze znaleziska, ich oddziaływanie na rozwój dziedziny, ograniczenia prac oraz dalsze perspektywy stojące przed badaną tematyką.

Populacje pacjentów ze STEMI włączone do publikacji pierwszej i drugiej mają różną wyjściową charakterystykę, dobraną do postawionych celów badawczych. Praca pierwsza miała sprawdzić zależności pomiędzy uszkodzeniem miokardium a zmianami metabolicznymi argininy, z kolei druga praca miała oszacować zależności pomiędzy metabolizmem argininowym i zmianami w tętnicy dozawałowej. Pierwsza publikacja dotyczy pacjentów o znacznie wyższym bezpośrednim ryzyku sercowo-naczyniowym. Włączono do niej 74% pacjentów z zawałem ściany przedniej, wyjściowo w 90% z zamkniętą IRA, o medianie czasu niedokrwienia 220 minut, co skutkowało spadkiem frakcji wyrzutowej lewej komory do 42%. Pacjenci w drugiej publikacji o typowym dla STEMI populacyjnym rozkładzie IRA mieli zawał ściany przedniej rzadziej w 47%, częściej, bo u prawie 40% z nich podczas pierwszego podania kontrastu IRA była drożna, a mediana czasu niedokrwienia była krótsza i wyniosła 147 minut, co w efekcie przełożyło się na mniejsze niż w pierwszej pracy uszkodzenie lewej komory z frakcją wyrzutową 55%. To wpłynęło na wartości oznaczeń parametrów argininowych, niemniej w obu populacjach było widoczne

przesunięcie w metabolizmie argininy w kierunku arginazy kosztem NOS w ostrej fazie w porównaniu do fazy przewlekłej.



Rycina 2. Zmiany w metabolizmie argininy w zawale mięśnia sercowego. Podsumowanie w tekście dyskusji.

Objaśnienia: NO: tlenek azotu, eNOS/iNOS: śródbłonkowa/indukowalna syntaza tlenu azotu, CAT: kationowy transporter aminokwasowy, SDMA: symetryczna dimetyloargininy, MMA: mono-metylarginina, ADMA: symetryczna dimetyloargininy.

Dotychczasowe doniesienia nie opisywały wyczerpująco zmian metabolizmu argininy podczas MI u człowieka. Uzyskane wyniki wskazują na przesunięcie metabolizmu argininy w stronę arginazy w trakcie ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego w porównaniu do oznaczeń po 6 miesiącach w fazie stabilnej (Rycina 2). Według najlepszej wiedzy autorów w przedstawionych pracach po raz pierwszy zestawiono dynamiczne zmiany w metabolizmie argininy ze stopniem okołozawałowego uszkodzenia miokardium, jak również ze stopniem

zaawansowania miażdżycy w nasierdziowej tętnicy wieńcowej. Wyniki pierwszej publikacji potwierdzają istotny ilościowy związek pomiędzy stężeniami osoczymi argininy, ornityny, cytruliny i ADMA a morfologicznymi cechami uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego lewej komory opisanymi w CMR takimi jak AAR, IS oraz obecność MVO. Z kolei wyniki drugiej publikacji wskazują, że metabolizm argininy przesunięty w stronę arginazy kosztem NOS w ostrej fazie MI, związany jest z częstszym występowaniem TCFA w zmianie odpowiedzialnej za MI, a po 6 miesiącach z większą grubością błony wewnętrznej, a także kompleksu intima-media w odcinku przylegającym do zmiany ranliwej. Obserwacje z obu prac stwarzają przesłanki do tego, aby metabolity argininy brać pod uwagę jako wskaźniki rozległości MI a z drugiej strony jako biomarkery umożliwiające śledzenie procesu miażdżycowego. Warto zaznaczyć, że na podstawie bazy danych *Web of Science*, aktualna na dzień złożenia rozprawy doktorskiej liczba cytowań w pracach pełnotekstowych wynosiła siedem dla pierwszej publikacji (opublikowanej w 2021 roku) i jedno dla trzeciej publikacji. Publikacja pierwsza została zacytowana w czasopiśmie *Journal of Internal Medicine* [48], w pracy powstałej pod kierunkiem Johna Pernow, eksperta od metabolizmu argininowego. W powyższej publikacji potwierdzono zwiększoną aktywność arginazy 1 wśród chorych z zawałem mięśnia sercowego STEMI, niemniej nie stwierdzono zależności pomiędzy osoczymym poziomem arginazy 1 i strefą zawału ocenioną w MR. Pierwsza publikacja została również zacytowana w czasopiśmie *European Journal of Heart Failure*, w której opisano profil transkrypcyjny u chorych z niewydolnością serca [49].

Analizy przeprowadzone w pracy pierwszej i drugiej oparto na grupach o średniej liczebności, których wielkość nie była planowana do weryfikacji hipotez klinicznych. Stąd uzyskane wyniki należy traktować jako wstępne, a kliniczna wartość prognostyczna metabolitów argininy musi być zweryfikowana w badaniach opartych na większej populacji [50]. Po drugie, próbki krwi badane w ostrej fazie MI nie były pobrane na czczo, przez co nie

można wykluczyć wpływu aminokwasów pochodzących z diety na uzyskane wyniki. Poziom metabolitów argininy oraz NOx mógł być także zaburzony przez nieanalizowane zmienności metabolizmu wątroby czy klirensu nerkowego azotanów [51, 52]. Po trzecie, metabolizm argininy związany z erytrocytami również nie był oceniany, stąd przeprowadzona analiza osocza krwi odzwierciedla jedynie część metabolizmu argininowego pełnej krwi [53, 54]. W końcu, przeprowadzone badania nie dają możliwości oceny wpływu towarzyszącej terapii lekami hamującymi os renina-angiotenzyna-aldosteron czy statynami.

Wyniki obu publikacji mogą stać się punktem wyjścia do ponownej oceny efektów leków ingerujących w metabolizm argininy, w tym inhibitorów arginazy oraz suplementacji argininy. Dotychczasowe doniesienia odnoszące się do tych zagadnień przedstawiają niejednoznaczne wnioski. Z kolei użyteczność metabolitów argininy jako potencjalnych biomarkerów MI oraz określenie profilu ekspresji genów uczestniczących w metabolizmie argininy potwierdziła praca Aa N i wsp. opublikowana w połowie 2021 roku [55]. Autorzy tej pracy pokazują, że wartość metabolitów argininy jako biomarkerów MI i/lub miazdżycy powinna być zestawiona z szczegółowymi analizami genetycznymi dotyczącymi podstaw funkcjonowania arginazy i innych enzymów biorących udział w metabolizmie argininy. Poznanie mechanizmów aktywacji i ekspresji genów odpowiedzialnych za metabolizm argininy w trakcie MI mogłoby zredukować siłę czynników zakłócających ten metabolizm jak wspomniane zmienności związane z dietą czy lekami stosowanymi po zawale.

## **Wnioski**

Podczas ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego dochodzi do zwiększenia względnej aktywności arginazy kosztem NOS w porównaniu z fazą stabilną. W ostrej fazie zwiększone osoczowe stężenie argininy i jej metabolitów wiąże się z większym uszkodzeniem miokardium i mikrokrążenia, a przesunięcie metaboliczne w kierunku arginazy kosztem NOS jest nasilone u pacjentów z obecnością TCFA w obrębie zmiany odpowiedzialnej za MI.

Utrzymujące się przesunięcie metaboliczne w kierunku arginazy w fazie przewlekłej jest skorelowane z większą grubością warstwy intima-media w stabilnych odcinkach IRA przylegających do blaszki ranliwej. Z kolei obniżone wartości argininy i zwiększona wartość wskaźnika ornityna/arginina w fazie stabilnej są związane z niekorzystnym odległym rokowaniem klinicznym.

## 9. Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim

### Wprowadzenie

Arginina jest substratem do produkcji tlenku azotu (NO, ang. *nitric oxide*), która zależy m.in. od równowagi pomiędzy aktywnością syntazy tlenku azotu (NOS, ang. *nitric oxide synthase*) i arginazy. Modele eksperymentalne wskazują, że w trakcie niedokrwienia mięśnia sercowego dochodzi do wzrostu aktywności arginazy i jednocześnie zmniejszenia produkcji NO. Metabolizm argininy w zawale mięśnia sercowego (MI, ang. *myocardial infarction*) u człowieka oraz jego związek ze stopniem uszkodzenia miokardium czy obecnością niestabilnych i nasileniem stabilnych zmian w tętnicy dozawałowej (IRA, ang. *infarct related artery*) nie jest w pełni przebadany. Postuluję, iż i) w ostrej fazie MI u człowieka w porównaniu ze stabilną fazą, arginina jest metabolizowana intensywniej przez arginazę aniżeli przez NOS, ii) względnie zwiększona aktywność arginazy w ostrej fazie MI wyrażona w postaci zaburzonej równowagi metabolitów argininy wiąże się ze zwiększonym obszarem uszkodzenia miokardium a także może mieć związek z niekorzystną morfologią zmiany odpowiedzialnej za MI w obrębie IRA, iii) utrzymująca się w obserwacji odległej zwiększona aktywność arginazy wiąże się z większym ładunkiem stabilnej blaszki miażdżycowej przylegającej do zmiany ranliwej oraz, że iv) zwiększona aktywność arginazy może mieć związek z wystąpieniem niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych.

### Cele pracy:

1. Ocena stężenia metabolitów argininy w ostrej fazie MI i w obserwacji odległej i na tej podstawie oszacowanie zmian w metabolizmie argininy u człowieka.
2. Powiązanie zmian w metabolizmie argininy ze stopniem uszkodzenia miokardium.
3. Powiązanie zmian w metabolizmie argininy ze zmianami w błonie wewnętrznej i środkowej zarówno zmiany niestabilnej, jak i przylegającego do niej stabilnego regionu.



4. Zbadanie związku pomiędzy zmianami w metabolizmie argininy a rokowaniem klinicznym.

## **Metodyka**

Oznaczenia poziomu argininy i jej metabolitów, a także azotanów i azotynów wykonano z użyciem ultraszybkiej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią masową (UPLC-MS/MS, ang. *ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) z zastosowaniem aparatu Waters ACQUITY UPLC (Waters Corporation, Milford, MA, USA) sprzężonego ze spektrometrem mas Waters TQD.

W pierwszym badaniu zmierzono metabolity argininy u 70 pacjentów z zawałem mięśnia sercowego z uniesieniem odcinka ST (STEMI, ang. *ST segment elevation myocardial infarction*) leczonych metodą pierwotnej angioplastyki wieńcowej (pPCI, ang. *primary percutaneous coronary intervention*) wyjściowo oraz po 6 miesiącach. Wyniki oznaczeń zestawiono z parametrami ocenionymi w rezonansie magnetycznym serca takimi jak: funkcja skurczowa lewej komory (LV, ang. *left ventricle*), jej masa i objętości oraz strefa zagrożona martwicą (AAR, ang. *area at risk*), strefa zawału (IS, ang. *infarct size*), uszkodzenie mikrokrążenia (MVO, ang. *microvascular obstruction*), a także wystąpieniem złożonego punktu końcowego (zgonu, zawału lub hospitalizacji z powodu niewydolności serca).

W drugim badaniu u 100 pacjentów ze STEMI leczonym także metodą pPCI oceniono metabolity argininy przy przyjęciu oraz po 6 miesiącach i porównano je z budową ściany IRA zobrazowanej przy użyciu optycznej tomografii koherencyjnej (OCT, ang. *optical coherence tomography*) ze szczególnym uwzględnieniem struktury zmiany odpowiedzialnej za MI w tym obecności cienkiej czapeczki włóknistej (TCFA, ang. *thin-cap fibroatheroma*) oraz struktury 10-milimetrowego segmentu przylegającego do niej proksymalnie i dystalnie. Zbadano również znaczenie metabolitów argininy i jej indeksów dla prognozowania

wystąpienia złożonego punktu końcowego (zgonu, ponownego zawału lub udaru). Grupę kontrolną stanowiło 25 pacjentów z przewlekłym zespołem wieńcowym, u których nie stwierdzono zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych pomimo dodatnich wyników badań obciążeniowych.

## Wyniki

W pierwszym badaniu wskaźnik cytrulina/arginina był niższy w ostrej fazie MI w porównaniu do obserwacji odległej ( $P=0,002$ ). W ostrej fazie MI, im większe było osoczowe stężenie argininy, cytruliny, ornityny i asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA, ang. *asymmetric dimethylarginine*), tym większa była wartość wskaźnika masy AAR odniesionego do masy LV i masy IS do masy LV. Ponadto stężenie argininy ( $P=0,021$ ) oraz ADMA ( $P=0,009$ ) było wyższe, a stężenie azotanów i azotynów ( $P=0,003$ ) było niższe u chorych z MVO w porównaniu do tych bez MVO. Analiza wieloczynnikowa metodą regresji Coxa wykazała, że stężenie argininy  $<29 \mu\text{M}$  mierzone po 6 miesiącach od zawału po uwzględnieniu poprawek na wiek, płeć oraz IS było niezależnie związane z ponad 2,5-krotnie częstszym wystąpieniem złożonego punktu końcowego w obserwacji 5-letniej. Wyniki drugiego badania wskazują na to, że w ostrej fazie MI wskaźniki cytrulina/arginina, cytrulina/ornityna były niższe, a wskaźniki ornityna/arginina oraz prolina/argininy były wyższe w porównaniu z oznaczeniami z fazy przewlekłej ( $P<0,001$  dla wszystkich wartości). Chorzy z TCFA obecna w zmianie odpowiedzialnej za zawał mieli w ostrej fazie MI wyższe wartości ADMA ( $P=0,015$ ), ornityny ( $P=0,003$ ) i wskaźnika ornityna/arginina ( $P=0,045$ ) oraz niższe wartości indeksów cytrulina/ornityna ( $P=0,003$ ) i arginina/ADMA ( $P=0,04$ ) w porównaniu do pacjentów bez TCFA. Średnia grubość kompleksu intima-media stabilnego regionu IRA przylegającego do blaszki ranliwej korelowała z oznaczonym w fazie stabilnej wskaźnikiem ornityna/arginina ( $R=0,337$ ;  $P=0,003$ ). Analizy wieloczynnikowe pokazały, że

wyższa wartość wskaźnika cytrulina/ornityna w ostrej fazie wiązała się z niższym ryzykiem obecności TCFA (iloraz szans 0,978, 95% przedział ufności dla ilorazu szans 0,962-0,994,  $P=0,006$ ), podczas gdy wyższy wskaźnik ornityna/arginina w okresie obserwacji korelował z większą średnicą stabilnego regionu IRA przylegającego do blaszki ranliwej (beta 0,227, 95% przedział ufności dla beta 0,045-0,409,  $P=0,018$ ). Trzecia praca, opis trzech pacjentów operowanych z powodu zwężenia zastawki aortalnej, u których doszło do zawału wskutek śródoperacyjnego rozwarstwienia tętnicy wieńcowej, pokazuje, że ta rzadka postać zawału obarczona jest ekstremalnym ryzykiem.

## **Wnioski**

Podczas ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego dochodzi do zwiększenia aktywności arginazy kosztem NOS w porównaniu z fazą stabilną. W ostrej fazie zwiększone osoczowe stężenie argininy i jej metabolitów wiąże się z większym uszkodzeniem miokardium i mikrokrążenia, a przesunięcie metaboliczne w kierunku arginazy kosztem NOS jest nasilone u pacjentów z obecnością TCFA w obrębie zmiany odpowiedzialnej za MI. Utrzymujące się przesunięcie metaboliczne w kierunku arginazy w fazie przewlekłej koreluje z większą grubością warstwy intima-media w stabilnych odcinkach IRA przylegających do blaszki ranliwej. Z kolei obniżone wartości argininy i zwiększona wartość wskaźnika ornityna/arginina w fazie stabilnej są związane z niekorzystnym odległym rokowaniem klinicznym.

## 10. Streszczenie pracy doktorskiej w języku angielskim

### Introduction

Arginine is a substrate for nitric oxide (NO) synthesis and depends on the competition of nitric oxide synthase (NOS) and arginase. Experimental models provide arguments that during acute phase of myocardial infarction (MI) arginase activity increases simultaneously with decreased NO synthesis. There is no sufficient data about alterations in arginine metabolism during MI in human and its association with myocardial injury, incidence of vulnerable coronary plaques and burden of stable coronary intima-media lesions. I hypothesize that i) during acute MI phase in human arginine metabolism is shifted from NOS towards arginase, ii) enhanced arginase activity expressed as an altered balance of arginine metabolites is associated with myocardial damage and with unfavorable morphology of a culprit lesion in the infarct-related artery (IRA), iii) persistent enhanced arginase activity during follow-up is associated with increased intima-media burden adjacent to culprit region and that iv) enhanced arginase activity potentially might be useful for prediction of adverse clinical events.

### Aims:

1. To measure arginine metabolites in acute phase of MI and during stable 6-month follow up and to estimate shifts in arginine metabolism in human.
2. To compare alterations in arginine metabolites balance with myocardial injury.
3. To compare alterations in arginine metabolites balance with morphology of a culprit lesion and of an adjacent to the culprit region of IRA.
4. To evaluate association between arginine metabolites balance and clinical prognosis after MI.

## Methods

Plasma concentrations of arginine, its metabolites and nitrite/nitrate (NO<sub>x</sub>) were measured in duplicates using ultraperformance liquid chromatography- tandem mass spectrometer (UPLC-MS/MS) with Waters ACQUITY UPLC (Waters Corporation, Milford, MA, USA) coupled to a Waters TQD mass spectrometer (electrospray ionization mode ESI-tandem quadrupole). In the first study, seventy consecutive ST segment elevation myocardial infarction (STEMI) patients who underwent primary percutaneous coronary intervention (pPCI) were enrolled and plasma concentrations of arginine metabolites were measured using at baseline and at 6 months. Arginine metabolites and their indices were compared with left ventricle (LV) function, volumes, mass, area at risk (AAR), infarct size (IS) and microvascular obstruction (MVO) in cardiac magnetic resonance and with incidence of composite endpoint (death, recurrent MI or hospitalization due to heart failure) during follow-up. In the second study one hundred consecutive STEMI patients who underwent pPCI were enrolled and plasma concentrations of arginine metabolites were measured at baseline and at 6 months. Again, arginine measurements were compared with morphology of culprit lesion, including presence of thin-cap fibroatheroma (TCFA) and of adjacent to the culprit proximal and distal 10 millimeters segments assessed with optical coherence tomography. The composite ischemic endpoint in this study was death, recurrent MI, stroke, or unplanned PCI due to unstable angina. As controls served 25 patients without atherosclerotic lesions in coronary angiography despite positive stress tests for ischemia, similar to the MI group in terms of demographics, cardiovascular risk factors and comorbidities.

## Results

In the first study, following ischemia median citrulline/arginine index decreased when compared with 6-month result ( $P=0,002$ ). Baseline median concentrations of arginine, citrulline, ornithine and asymmetric dimethylarginine (ADMA) were correlated with ratios of AAR/LV and IS/LV. The concentrations of arginine ( $P=0,021$ ) and ADMA ( $P=0,009$ ) were higher but NOx ( $P=0,003$ ) was lower in patients with MVO when compared to subjects without MVO. By Cox regression, arginine concentration lower  $<29 \mu\text{M}$  as measured 6 months following MI adjusted to age, sex and IS was independently associated with 2,5 more frequent composite endpoint including death, recurrent MI or heart failure hospitalization during 5-year follow-up. The results of the second study showed that during acute phase of MI the ornithine/arginine index and the proline/arginine index increased, while the citrulline/arginine index and the citrulline/ornithine index decreased as compared to 6-month follow-up ( $P<0,001$  for all). Patients with TCFA present in the IRA culprit lesion in an acute phase had higher plasma levels of ADMA ( $P=0,015$ ), ornithine ( $P=0,003$ ) and lower indices of citrulline/ornithine ( $P=0,003$ ) and arginine/ADMA ( $P=0,040$ ) when compared with patients without TCFA. A mean diameter of the intima or intima-media in the adjacent segment of the IRA correlated with the ornithine/arginine ratio measured at follow-up ( $R=0,337$ ;  $P=0,003$ ). By multivariable analysis, a higher citrulline/ornithine index as measured in acute MI phase was associated with a lower risk of TCFA presence (odds ratio 0,978; 95% confidence interval [CI] for odds ratio 0,962-0,994;  $P=0,006$ ) whereas a higher follow-up ornithine/arginine index correlated with larger intima-media diameter of adjacent segments (beta-coefficient 0,227, 95% CI for beta-coefficient 0,045–0,409;  $P = 0,018$ ). The third paper, a case report of three aortic valve stenosis patients who suffered from a periprocedural MI as a result of iatrogenic coronary artery dissection, showed extremely high risk of death associated with this rare complication.

## **Conclusions**

In acute phase of MI, plasma arginine metabolism is shifted from NOS towards arginase as compared with stable condition. Moreover, following acute ischemia plasma levels of arginine and its metabolites correlated with myocardial and microvascular injury while metabolic arginine shift from NOS towards arginase is associated with the presence of TCFA in the culprit region of IRA. In turn, similar persistent metabolic alterations in a stable chronic phase correlated with the thickness of intima or intima-media in the adjacent to the culprit segment of IRA. Decreased 6-month arginine concentration and increased ornithine/arginine index were associated with an unfavorable long-term outcome.

## 11. Piśmiennictwo

- [1] Morris SM Jr. Arginine Metabolism Revisited. *J Nutr*. 2016;146:2579S-2586S.
- [2] Ścibior D, Czeczot H: Arginina – metabolizm i funkcje w organizmie człowieka. *Postępy Hig Med Dośw* 2004, 58, 321–332.
- [3] Wu G, Morris SM Jr: Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998, 336, 1–17
- [4] Cziráki A, Lenkey Z, Sulyok E, i wsp. L-Arginine-Nitric Oxide-Asymmetric Dimethylarginine pathway and the coronary circulation: translation of basic science results to clinical practice. *Front Pharmacol*. 2020;11:569914.
- [5] Wu G, Meininger CJ, Knabe DA, i wsp.: Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000, 3, 59–66.
- [6] Wu G, Meininger CJ: Arginine nutrition and cardiovascular function. *J Nutr* 2000, 130, 2626–2629.
- [7] Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001;357:593-615.
- [8] Caldwell RW, Rodriguez PC, Toque HA, i wsp. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease. *Physiol. Rev*. 2018; 98, 641-665.
- [9] Pernow J, Jung C. Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? *Cardiovasc Res*. 2013;98:334-343.
- [10] McDonald KK, Zharikov S, Block ER, i wsp. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol Chem*. 1997;272:31213-31216.
- [11] Dioguardi FS. To give or not to give? Lessons from the arginine paradox. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2011;4:90-98.



- [12] Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, i wsp. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y<sup>+</sup> carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide*. 1997;1:65-73.
- [13] Förstermann, U, Sessa, WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33:829-37.
- [14] Bode-Böger SM, Scalera F, Ignarro LJ. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol Ther*. 2007;114:295-306.
- [15] Sourij H, Meinitzer A, Pilz S, i wsp. Arginine bioavailability ratios are associated with cardiovascular mortality in patients referred to coronary angiography. *Atherosclerosis*. 2011;218:220-225.
- [16] Wang Z, Tang WHW, Cho L, i wsp. Targeted metabolomic evaluation of arginine methylation and cardiovascular risks: potential mechanisms beyond nitric oxide synthase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:1383-1391.
- [17] Nicholls SJ, Wang Z, Koeth R, i wsp. Metabolic profiling of arginine and nitric oxide pathways predicts hemodynamic abnormalities and mortality in patients with cardiogenic shock after acute myocardial infarction. *Circulation*. 2007;116:2315-2324.
- [18] Tang WH, Wang Z, Cho L, i wsp. Diminished global arginine bioavailability and increased arginine catabolism as metabolic profile of increased cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:2061-2067.
- [19] Seljeflot I, Nilsson BB, Westheim AS, i wsp. The L-arginine-asymmetric dimethylarginine ratio is strongly related to the severity of chronic heart failure. No effects of exercise training. *J Card Fail*. 2011;17:135-142.
- [20] Cyr, AR, Huckaby, LV, Shiva, SS, i wsp. Nitric oxide and endothelial dysfunction. *Crit Care Clin*. 2020;36:307-321.
- [21] Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115:1285-1295.

- [22] Singh, S, Torzewski, M. Fibroblasts and their pathological functions in the fibrosis of aortic valve sclerosis and atherosclerosis. *Biomolecules*. 2019;9:472.
- [23] Ming XF, Barandier C, Viswambharan H, i wsp. Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction. *Circulation*. 2004;110:3708-3714.
- [24] Ryoo S, Gupta G, Benjo A, i wsp. Endothelial arginase II: a novel target for the treatment of atherosclerosis. *Circ Res*. 2008;102:923-932.
- [25] Hayashi T, Esaki T, Sumi D, i wsp. Modulating role of estradiol on arginase II expression in hyperlipidemic rabbits as an atheroprotective mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:10485-10490.
- [26] Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, i wsp. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:8264-8268.
- [27] Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, i wsp. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;206:667-673.
- [28] Gallardo-Soler A, Gómez-Nieto C, Campo ML, i wsp. Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/delta-mediated effect that links lipid metabolism and immunity. *Mol Endocrinol*. 2008;22:1394-1402.
- [29] Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, i wsp. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One*. 2010;5:e8852.
- [30] Wei LH, Wu G, Morris SM Jr, i wsp. Elevated arginase I expression in rat aortic smooth muscle cells increases cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:9260-9264.

- [31] Yang Z, Ming XF. Endothelial arginase: a new target in atherosclerosis. *Curr Hypertens Rep.* 2006;8:54-59.
- [32] Schlüter KD, Schulz R, Schreckenber R. Arginase induction and activation during ischemia and reperfusion and functional consequences for the heart. *Front Physiol.* 2015;6:65.
- [33] Lefer, AM, Tsao, PS, Lefer, DJ, i wsp. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J.* 1991;5:2029-2034.
- [34] Tiefenbacher, CP, Chilian, WM, Mitchell, M i wsp. Restoration of endothelium-dependent vasodilation after reperfusion injury by tetrahydrobiopterin. *Circulation.* 1996;94:1423-1429.
- [35] Weyrich, AS, Ma, X, Lefer, AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation.* 1992; 86:279-288.
- [36] Schreckenber R, Weber, P, Cabrera-Fuentes, HA, i wsp. Mechanism and consequences of the shift in cardiac arginine metabolism following ischaemia and reperfusion in rats. *Thromb Haemost.* 2015;113:482-493.
- [37] McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, i wsp. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *The American journal of physiology.* 1994;267; H1921–H1927.
- [38] Reffelmann T, Kloner RA. Microvascular reperfusion injury: rapid expansion of anatomic no reflow during reperfusion in the rabbit. *Am. J. Physiol.* 2002;283:H1099-H1107.
- [39] Su Y, Block ER. Acute hypoxia increases intracellular L-arginine content in cultured porcine pulmonary artery endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 1996;167:349-353.
- [40] Zharikov SI, Herrera H, Block ER. Role of membrane potential in hypoxic inhibition of L-arginine uptake by lung endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1997;272:L78-L84.

- [41] Gonon AT, Jung C, Katz A, i wsp. Local arginase inhibition during early reperfusion mediates cardioprotection via increased nitric oxide production. *PLoS One*. 2012;7:e42038.
- [42] Tratsiakovich Y, Gonon AT, Kiss A, i wsp. Myocardial protection by co-administration of L-arginine and tetrahydrobiopterin during ischemia and reperfusion. *Int J Cardiol*. 2013;169:83-88.
- [43] Schulman SP, Becker LC, Kass DA, i wsp. L-arginine therapy in acute myocardial infarction: the vascular interaction with age in myocardial infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *JAMA*. 2006;295:58-64.
- [44] Tratsiakovich Y, Gonon AT, Kiss A, i wsp. Myocardial protection by co-administration of L-arginine and tetrahydrobiopterin during ischemia and reperfusion. *Int J Cardiol*. 2013;169:83-88.
- [45] Zalewski J, Claus P, Bogaert J, i wsp. Cyclosporine A reduces microvascular obstruction and preserves left ventricular function deterioration following myocardial ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol*. 2015;110:18.
- [46] Tearney GJ, Regar E, Akasaka T, i wsp. Consensus standards for acquisition, measurement, and reporting of intravascular optical coherence tomography studies: a report from the International Working Group for Intravascular Optical Coherence Tomography Standardization and Validation. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:1058-72.
- [47] Giustarini D, Rossi R, Milzani A, i wsp. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. *Methods Enzymol*. 2008;440:361-380.
- [48] Tengbom J, Cederström S, Verouhis D, i wsp. Arginase 1 is upregulated at admission in patients with ST-elevation myocardial infarction. *J Intern Med*. 2021;290:1061-1070.

- [49] Nath M, Romaine SPR, Koekemoer A, i wsp. Whole blood transcriptomic profiling identifies molecular pathways related to cardiovascular mortality in heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2022;24:1009-1019.
- [50] Jankowski P, Topór-Mądry R, Gąsior M, i wsp. Management and predictors of clinical events in 75 686 patients with acute myocardial infarction. *Kardiol Pol.* 2022; 80: 468-475
- [51] DeMartino AW, Kim-Shapiro DB, Patel RP, i wsp. Nitrite and nitrate chemical biology and signalling. *Br J Pharmacol.* 2019;176:228-245.
- [52] Kim-Shapiro DB, Gladwin MT. Pitfalls in measuring NO bioavailability using NOx. *Nitric Oxide.* 2015;44:1-2.
- [53] Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, i wsp. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood.* 2006;107:2943-2951.
- [54] Cortese-Krott MM, Rodriguez-Mateos A, Sansone R, i wsp. Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease. *Blood.* 2012;120:4229-4237.
- [55] Aa N, Lu Y, Yu M, i wsp. Plasma metabolites alert patients with chest pain to occurrence of myocardial infarction. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:652746.

## 12. Opinia Komisji Bioetycznej

### OPINIA

**nr. 122.6120.61.2016 z dnia 31 marca 2016 roku**

Na zebraniu w dniu 31 marca 2016 r. Komisja zapoznała się z wnioskiem z dnia 18 marca 2016 r.

złożonym:

przez kierownika tematu: **dr hab. med. Jarosław Zalewski**  
zatrudnionego w: **Klinika Choroby Wieńcowej  
i Niewydolności Serca UJCM  
31 – 202 Kraków, ul. Prądnicka 80**

oraz jego merytorycznym uzasadnieniem dotyczącym przeprowadzenia eksperymentu medycznego pt. „Przetrwale ryzyko prozakrzepowe po zawale mięśnia sercowego jako efekt niestabilności blaszki miażdżycowej, budowy zakrzepu wewnątrzwieńcowego oraz odpowiedzi ogólnoustrojowej”.

#### Do wniosku dołączono:

1. Protokół badania.
2. Lista piśmiennictwa.
3. Informacja dla uczestnika badania.
4. Formularz świadomej zgody pacjenta na udział w badaniu.
5. Formularz zgody na przetwarzanie danych osobowych.
6. Życiorys naukowy wnioskodawcy.
7. Oświadczenie o realizacji projektu w ramach prac badawczych UJ/UJCM.

Komisja wyraża pozytywną opinię w sprawie przeprowadzenia wnioskowanych badań - na warunkach określonych we wniosku oraz dodatkowo zastrzegając:

1/ obowiązek uzyskania pisemnej zgody każdej osoby wyrażającej wolę (gotowość) udziału w danym eksperymencie, zgodnie z obowiązującym przepisami,

2/ obowiązek przedstawienia Komisji:

- wszystkich zmian w protokole mających wpływ na przebieg oraz ocenę badania,
- zawiadomienia o przyczynach przedwczesnego zakończenia badania,
- sprawozdania w toku przeprowadzanych badań - co sześć miesięcy,
- raportu końcowego,

3/ warunek zamieszczenia w formularzu wniosku informacji o specjalizacji członków zespołu badawczego, szczegółowej informacji o zasadach współpracy z innymi ośrodkami, informacji o sposobie rekrutacji pacjentów do OCT oraz informacji o miejscu i osobie wykonującej badania zakrzepów i badania proteomiczne,

4/ warunek zamieszczenia w formularzu „informacja dla uczestnika badania” informacji o potencjalnym ryzyku związanym z przeprowadzeniem procedury OCT.

**Badanie może być prowadzone do dnia 31 marca 2017 roku.**

**Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi.  
Lista członków Komisji biorących udział w posiedzeniu stanowi załącznik do niniejszego dokumentu.**

Kraków, dnia 31 marca 2016 r.

Przewodniczący  
Komisji Bioetycznej UJ

*Prof. dr hab. n. med. Piotr Thor*

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ UJ  
DO WYŁĄCZNEGO WYKORZYSTANIA  
DLA CELÓW STATUTOWYCH  
UNIWERSYTETU JAGIELLOŃSKIEGO



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Komisja Bioetyczna

Uniwersytetu

Jagiellońskiego

ul. Grzegorzewska 20

PL 31-531 Kraków

tel. +48 (12) 433 27 39

kbet@cm-uj.krakow.pl

www.kbet.cm-uj.krakow.pl



## KOMISJA BIOETYCZNA UNIWERSYTETU JAGIELLOŃSKIEGO

31-010 Kraków, ul. Jagiellońska 10 tel./fax: 012 431-26-59  
e-mail: komisja\_bioetyczna@em-uj.krakow.pl ; www.em-uj.krakow.pl/komisja\_bioetyczna/

### OPINIA

#### nr KBET/120/B/2007 z dnia 15 listopada 2007 roku

Na zebraniu w dniu 15. 11. 2007 r. Komisja zapoznała się z wnioskiem z dnia 12.11.2007 r. złożonym

przez kierownika tematu: **Prof. dr hab. n med. Krzysztof Żmudka**  
zatrudnionego w **Zakład Hemodynamiki i Angiokardiografii UJCM**  
**31-202 Kraków, ul. Prądnicza 80**

oraz jego merytorycznym uzasadnieniem dotyczącym przeprowadzenia eksperymentu medycznego pt. „Uszkodzenie pozawałowe miokardium i mikrokrążenia a właściwości skrzepu i aktywności płytek u pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego leczonym metodą pierwotnej angioplastyki wieńcowej”.

#### Do wniosku dołączono:

1. Protokół badania wraz z listą piśmiennictwa.
2. Życiorys naukowy wnioskodawcy.
3. Informacja dla uczestnika badania.
4. Formularz świadomej zgody pacjenta.
5. Formularz zgody pacjenta na przetwarzanie danych osobowych.

Komisja wyraża pozytywną opinię w sprawie przeprowadzenia wnioskowanych badań - na warunkach określonych we wniosku oraz dodatkowo zastrzegając:

- 1/ obowiązek uzyskania pisemnej zgody każdej osoby wyrażającej wolę (gotowość) udziału w danym eksperymencie, zgodnie z obowiązującym przepisami.
- 2/ obowiązek przedstawienia Komisji:
  - wszystkich zmian w protokole mających wpływ na przebieg oraz ocenę badania,
  - wszystkich przypadków poważnych zdarzeń niepożądanych,
  - zawiadomienia o przyczynach przedwczesnego zakończenia badania,
  - sprawozdania w toku przeprowadzanych badań - za sześć miesięcy,
  - raportu końcowego,
- 3/ warunek uzasadnienia w dokumentacji badania celowości pobierania 60 ml krwi od pacjenta,
- 4/ warunek podania w dokumentacji badania informacji o miejscu wykonywania badania skrzepu i aktywności płytek krwi,
- 5/ warunek przeredagowania formularza „Informacja dla uczestnika badania” poprzez skrócenie jej tekstu, użycie języka zrozumiałego dla pacjenta, a także wykreślenie sformułowania: „...w razie odmowy Pan/Pani nie zostanie w żaden sposób ukarany”.

**Badanie może być prowadzone do dnia 15 listopada 2008 roku.**

**Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi. Lista członków Komisji biorących udział w posiedzeniu stanowi załącznik do niniejszego dokumentu.**

Kraków, 15 listopada 2007 r.

Przewodniczący  
Komisji Bioetycznej UJ  
  
Prof. dr hab. Piotr Thor

### 13. Oświadczenia współautorów

Kraków, dnia 17.10.2022

Lek. Patrycja Mołek-Dziadosz  
/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

#### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The shifted balance of arginine metabolites in acute myocardial infarction patients and its clinical relevance” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: koncepcja pracy, rekrutacja pacjentów, analiza oznaczeń laboratoryjnych, interpretacja wyników, przygotowanie danych do publikacji, pisanie manuskryptu.

Oświadczam, iż moja samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Patrycja Mołek-Dziadosz  
/podpis współautora/



Kraków, dnia 17.10.2022

Dr Paweł Żmudzki

/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The shifted balance of arginine metabolites in acute myocardial infarction patients and its clinical relevance” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: analiza oznaczeń laboratoryjnych i ich interpretacja.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Patrycji Molek-Dziadosz przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM  
Zakład Chemii Leków



dr Paweł Żmudzki  
Asystent

.....  
/podpis współautora/

Kraków, dnia 17.10.2022

Lek. Aleksandra Włodarczyk  
/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The shifted balance of arginine metabolites in acute myocardial infarction patients and its clinical relevance” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: rekrutacja pacjentów, pomoc w interpretacji wyników.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład **lek Patrycji Molek-Dziadosz** przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

  
/podpis współautora/

Kraków, dnia 17.10.2022

Prof. dr hab. n. med. Jadwiga Nessler  
/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The shifted balance of arginine metabolites in acute myocardial infarction patients and its clinical relevance” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: pomoc w interpretacji wyników, akceptacja finalnej wersji manuskryptu.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład **lek. Patrycji Molek-Dziadosz** przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

  
.....  
/podpis współautora/

Kraków, dnia 17.10.2022


Dr hab. n. med. Jarosław Zalewski

/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The shifted balance of arginine metabolites in acute myocardial infarction patients and its clinical relevance” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: koncepcja pracy, rekrutacja pacjentów, analiza wyników, ich interpretacja oraz przygotowanie manuskryptu.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Patrycji Molek-Dziadosz przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy oraz przygotowaniu publikacji.

  
.....  
/podpis współautora/

Kraków, dnia 17.10.2022

Lek. Patrycja Mołek-Dziadosz  
/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Thin-cap fibroatheroma and increased coronary intima-media thickness are associated with an altered arginine metabolites balance” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: koncepcja pracy, rekrutacja pacjentów, analiza oznaczeń laboratoryjnych, interpretacja wyników, przygotowanie danych do publikacji, pisanie manuskryptu.

Oświadczam, iż moja samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

.....Patrycja Mołek-Dziadosz.....  
/podpis współautora/

Kraków, dnia 17.10.2022

Dr Paweł Żmudzki

/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

#### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Thin-cap fibroatheroma and increased coronary intima-media thickness are associated with an altered arginine metabolites balance” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: analiza oznaczeń laboratoryjnych i ich interpretacja.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Patrycji Molek-Dziadosz przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM  
Zakład Chemii Leków



dr Paweł Żmudzki  
Asystent

.....  
/podpis współautora/

Kraków, dnia 17.10.2022

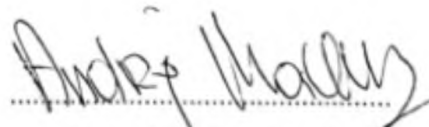
Dr n. med. Andrzej Machnik

/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Thin-cap fibroatheroma and increased coronary intima-media thickness are associated with an altered arginine metabolites balance” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: rekrutacja pacjentów.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek **Patrycji Molek-Dziadosz** przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

  
.....  
/podpis współautora/

Kraków, dnia 17.10.2022

Mgr Grażyna Nowak

/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Thin-cap fibroatheroma and increased coronary intima-media thickness are associated with an altered arginine metabolites balance” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: analiza obrazów tętnic wieńcowych uzyskanych metodą optycznej koherentnej tomografii.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład **lek Patrycji Molek-Dziadosz** przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



/podpis współautora/



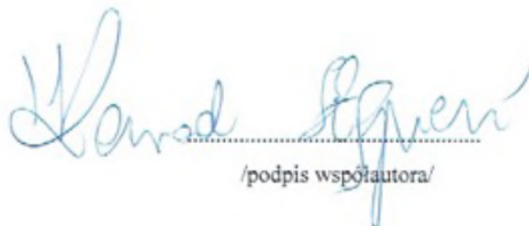
Kraków, dnia 17.10.2022

Lek. Konrad Stępień  
/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Thin-cap fibroatheroma and increased coronary intima-media thickness are associated with an altered arginine metabolites balance” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: rekrutacja pacjentów.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład **lek Patrycji Molek-Dziadosz** przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



.....  
/podpis współautora/

Kraków, dnia 17.10.2022

Dr n med. Mateusz Wnuk  
/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Thin-cap fibroatheroma and increased coronary intima-media thickness are associated with an altered arginine metabolites balance” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: rekrutacja pacjentów.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład **lek. Patrycji Molek-Dziadosz** przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



/podpis współautora/

Kraków, dnia 17.10.2022

Lek. Aleksandra Włodarczyk  
/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Thin-cap fibroatheroma and increased coronary intima-media thickness are associated with an altered arginine metabolites balance” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: rekrutacja pacjentów, pomoc w interpretacji wyników.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład **lek Patrycji Molek-Dziadosz** przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

  
/podpis współautora/

Kraków, dnia 17.10.2022

Lek. Karol Nowak

/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Thin-cap fibroatheroma and increased coronary intima-media thickness are associated with an altered arginine metabolites balance” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: rekrutacja pacjentów.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Patrycji Molek-Dziadosz przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



.....  
/podpis współautora/

Kraków, dnia 17.10.2022

Lek. Radosław Rychlak

/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Thin-cap fibroatheroma and increased coronary intima-media thickness are associated with an altered arginine metabolites balance” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: rekrutacja pacjentów.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek **Patrycji Molek-Dziadosz** przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



/podpis współautora/

Kraków, dnia 17.10.2022

Prof. dr hab. n. med. Jadwiga Nessler  
/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Thin-cap fibroatheroma and increased coronary intima-media thickness are associated with an altered arginine metabolites balance” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: pomoc w interpretacji wyników, akceptacja finalnej wersji manuskryptu.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład **lek. Patrycji Molek-Dziadosz** przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

  
.....  
/podpis współautora/

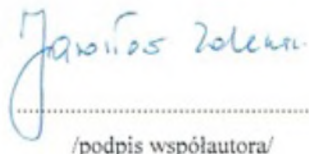
Kraków, dnia 17.10.2022

Dr hab. n. med. Jarosław Zalewski  
/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Thin-cap fibroatheroma and increased coronary intima-media thickness are associated with an altered arginine metabolites balance” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: koncepcja pracy, rekrutacja pacjentów, analiza wyników, ich interpretacja oraz przygotowanie manuskryptu.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład **lek Patrycji Molek-Dziadosz** przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy oraz przygotowaniu publikacji.

  
.....  
/podpis współautora/

Kraków, dnia 17.10.2022

Lek. Patrycja Molek-Dziadosz  
/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Coronary artery dissection following aortic valve replacement. How can one deal with this rare yet life-threatening complication?” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: koncepcja pracy, przygotowanie danych do publikacji, interpretacja wyników, pisanie manuskryptu.

Oświadczam, iż moja samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład przy opracowywaniu koncepcji, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

.....  
Patrycja Molek-Dziadosz  
/podpis współautora/



Kraków, dnia 17.10.2022

Prof. dr hab. n. med. Jadwiga Nessler  
/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Coronary artery dissection following aortic valve replacement. How can one deal with this rare yet life-threatening complication?” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: pomoc w interpretacji wyników, akceptacja finalnej wersji manuskryptu.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład **lek. Patrycji Molek-Dziadosz** przy opracowywaniu koncepcji, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

  
.....  
/podpis współautora/

Kraków, dnia 17.10.2022

Dr hab. n med. Jarosław Zalewski  
/tytuł zawodowy, imię i nazwisko/

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Coronary artery dissection following aortic valve replacement. How can one deal with this rare yet life-threatening complication?” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: koncepcja pracy, akceptacja finalnej wersji manuskryptu.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład **lek Patrycji Molek-Dziadosz** przy opracowywaniu koncepcji, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



/podpis współautora/